

TENT COOPERATION TRE.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION OF ELECTION**
(PCT Rule 61.2)

Date of mailing (day/month/year) 11 April 2001 (11.04.01)	To: Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE in its capacity as elected Office
International application No. PCT/JP00/05424	Applicant's or agent's file reference OP1056-PCT
International filing date (day/month/year) 11 August 2000 (11.08.00)	Priority date (day/month/year) 13 August 1999 (13.08.99)
Applicant ISHIDA, Isao et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 February 2001 (22.02.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Maria Kirchner Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2001年2月22日 (22.02.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/11951 A1(51)国際特許分類7:
A01K 67/027, C12N 15/00, C12Q 1/68, C12N 15/85, 5/10, G01N 33/50, 33/15

(ISHIDA, Isao) [JP/JP]. 富塚一磨 (TOMIZUKA, Kazuma) [JP/JP]. 黒岩義巳 (KUROIWA, Yoshimi) [JP/JP]; 〒370-1202 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内 Gunma (JP). 大島毅 (OHSHIMA, Takeshi) [JP/JP]. 鈴木睦 (SUZUKI, Mutsumi) [JP/JP]; 〒371-0853 群馬県前橋市総社町 1-2-2 麒麟麦酒株式会社 医薬開発研究所内 Gunma (JP). 伊藤邦郎 (ITO, Kunio) [JP/JP]; 〒319-1112 茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化学薬品株式会社 ゲノムサイエンス研究所内 Ibaraki (JP).

(21)国際出願番号:
PCT/JP00/05424(22)国際出願日:
2000年8月11日 (11.08.2000)(25)国際出願の言語:
日本語(26)国際公開の言語:
日本語(30)優先権データ:
特願平11/229094 1999年8月13日 (13.08.1999) JP

(74)代理人: 遠山勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒104-8288 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,

(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 石田功

[続葉有]

(54)Title: MOUSE HAVING HUMAN CYTOCHROME P450 TRANSFERRED THEREIN

(54)発明の名称: ヒトチトクロームP450遺伝子導入マウス

(57)Abstract: A fragment of the 7th chromosome originating in normal human fibroblast is transferred into a mouse ES cell (embryonic stem cell) by the microcell method. By using this ES cell, a chimeric mouse, which sustains the human chromosome fragment in normal tissues and expresses human CYP3A4 gene in the liver and the small intestine, is obtained. To disrupt mouse endogenous P450 genes, a physical map concerning Cyp3a genes on the mouse 5th chromosome is formed. Based on this physical map, a vector required in gene targeting is constructed. By using this vector, a mouse, which has the human P450 genes (CYP3A family) and in which the mouse endogenous P450 genes (Cyp3a family) have been disrupted, is constructed.

(57)要約:

ヒト正常線維芽細胞由来7番染色体の部分断片をミクロセル法によりマウスES細胞(胚性幹細胞)に導入し、このES細胞を用いて正常組織においてヒト染色体断片を保持し、薬剤の誘導によって肝臓、小腸においてヒトCYP3A4遺伝子を発現するキメラマウスを得る。また、マウス内在性P450遺伝子群を破壊するために、マウス5番染色体上のCyp3a遺伝子群に関する物理的地図を作製するとともに、その物理的地図をもとに遺伝子ターゲティングに必要なベクターを作製し、それを用いて、ヒトP450遺伝子(CYP3Aファミリー)を有し、さらにマウス内在性のP450遺伝子(Cyp3aファミリー)が破壊されたマウスを作製する。

WO 01/11951 A1



PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイド」を参照。

明細書

ヒトチトクロームP450遺伝子導入マウス

技術分野

本発明は、ヒト型の薬物代謝を示す非ヒト動物を供給することを目的とし、チトクロームP450遺伝子群を含むヒト染色体断片を導入した非ヒト動物とその作製法に関するものである。

背景技術

薬物の体内での代謝は、主に肝臓に存在するチトクロームP450（以下、「P450」ともいう。）によって行われる。P450は、多くの遺伝子からなるスーパーファミリーを形成しており、アミノ酸配列に関して相同性が40%を超えるP450を同じファミリーとし、同じファミリー内でも55%以上のアミノ酸相同性を示すものについてはサブファミリーに分類する（Nelsonら, *Pharmacogenetics*, 6:1, 1996）。同じサブファミリーに属していても、ヒトとラットのP450を比較した場合では性質の違いが認められ、基質となる物質や代謝産物に違いが認められることがある。ゆえに、ある薬物の代謝についてラットでの情報をそのままヒトに適用することはできず、ヒトでの薬物代謝を正確に予測する試験系の開発が望まれている（船江ら, *バイオサイエンスとインダストリー*, 55:81, 1997）。

本来なら、ヒトでの薬物代謝を検討するのであれば、ヒト肝ミクロソームを用いるのが最善の手段であるが、ヒトの肝ミクロソームは入手が困難である。一方、遺伝子工学的な手法でヒトの酵素を比較的容易に作ることが可能になってきており、これによると安定して同一の規格のものを供給できることから、その利用が考えられる（鎌滝, （財）安評センター研究所報, 7:27, 1997）。

他方、P450により代謝されて活性化された薬物の生体への影響を調べるために、*in vitro*の系が構築されている。これは、肝ミクロソームと薬物を細胞の培養液中に添加することにより、細胞外で代謝された代謝産物の前記細胞への影響をみ

るものである。この場合、活性化された物質は細胞膜と吸着し、一部分しか細胞内に到達しない。したがって、細胞に対する代謝産物の影響を正確に把握することができない可能性がある。細胞そのものがP450を発現する場合、細胞膜に吸着することなく侵入した薬物が細胞内で活性化すると考えられ、毒性をはじめとする代謝産物による影響を適切に再現できると考えられる。このような観点から、ヒトP450遺伝子を導入した細胞を代謝産物の毒性評価に用いることが望ましいとされている (Kamatakiら, *Toxicology Letters*, 82-83:879, 1995)。

しかし、上記の*in vitro*での発現系を用いた方法は、いずれも何らかの問題点を抱えているのが現状である。ヒトP450を導入した酵母を用いた発現系（例えば、Kovalevaら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221:129, 1996）では、P450の発現量はある程度得られ、P450 cDNAを改変せずに発現できることなどの利点はあるものの、系に酵母自身のP450が含まれる問題がある。大腸菌を用いる発現系（例えば、Gilliamら, *Arch. Biochem. Biophys.*, 305:123, 1993）は取扱いが容易で大量に酵素を得ることができるもの、安定して発現させるためには発現させるP450のN-末端アミノ酸を改変する必要がある。また、この改変が酵素活性に影響を与える可能性が示唆されたり、大腸菌がP450活性を発揮するのに必要な還元酵素を持っていないため還元酵素を別に添加する必要があるなどの問題もある。昆虫細胞とバキュロウイルスを用いる系（例えば、Asseffaら, *Arch. Biochem. Biophys.*, 274:481, 1989）では発現量も多くN-末端アミノ酸の改変も必要ないが、発現のための操作に若干の熟練を要する。ヒト肝癌由来のHep G2細胞とワクシニアウイルスを用いる系（例えば、Shouら, *Mol. Carcinog.*, 10:159, 1994）やヒトBリンパ球を用いる系はヒトの細胞を用いることもあり、P450がより*in vivo*の環境に近い状態で発現していると考えられる。ただし、ワクシニアウイルスの使用を伴なう場合やHep G2細胞ミクロソームを用いる場合は、安全性に対する配慮が必要である（船江ら, *バイオサイエンスとインダストリー*, 55: 81, 1997）。

また、薬物代謝酵素の生物学的役割と制御については未だに完全には解明されていない。これらの動物細胞、酵母、昆虫、細菌を用いる実験系は、*in vitro*での薬物代謝と化学発癌におけるP450の役割を検討するモデルとなりうるが、薬物動態のパラメーターなど他の要素のために、*in vivo*における状態を充分には反

映していないことをふまえて使用しなくてはならない (Wolfら, *J. Pharm. Pharmacol.*, 50:567, 1998)。

ヒトのP450遺伝子が導入され、体内でヒトと同じ代謝産物を生成する実験動物ができれば、ヒトで特異的に生成する代謝産物であっても、その薬理作用はもとより毒性に関して動物を用いて検証できるなどの大きな利点があげられる(鎌滝ら, *薬物動態*, 13:280, 1998)。そのため、P450遺伝子を導入したトランスジェニックマウスについての研究も行われている。例えばRamsdenらは、ラットCyp2B2遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。ラットCyp2B2遺伝子の発現は、組織特異的、発生特異的に制御されると共に、フェノバルビタールによって発現が誘導されることが知られている。トランスジェニックマウスにおける、フェノバルビタールによるトランスジーンの発現誘導には800bpのプロモーター配列だけでは不充分であり、さらに上流の遺伝子配列が必要であることが示された。また、トランスジーンの発現のコントロールには、転写開始点の数十キロベース上流の配列が必要であり、これによって発現量や組織特異性も再現できる可能性が示された (Ramsdenら, *J. Biol. Chem.*, 268:21722, 1993)。

また、Liらは、ヒト胎児に特異的に発現するCYP3A7をもつトランスジェニックマウスを作製した (Liら, *Archs. Biochem. Biophys.*, 329:235, 1996)。この例ではメタロチオネインプロモーターが使用され、P450遺伝子の組織特異的な誘導発現は観察されなかった。すなわち、作製された6系統のトランスジェニックマウスのうち1系統のみで、導入したCYP3A7遺伝子の肝臓での発現が認められたが、他の系統ではさまざまな臓器において発現が認められた。したがって、肝臓特異的にP450遺伝子を発現させるためにはメタロチオネインプロモーターでは不充分であると考えられる。

CYP3Aに関しては、胎児期の毒性研究のためのツールとしての応用についての研究も行われている (Kamatakiら, *Toxicology Letters*, 82-83:879, 1995)。Campbellらは、ラットCyp1A1遺伝子のプロモーターとその上流配列をlacZ遺伝子と結合した遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、それによりCyp1A1プロモーターによる遺伝子発現の制御について解析を進めた (Campbellら, *J. Cell Sci.*, 109:2619, 1996)。これまでに、ヒトのP450遺伝子のひとつのサ

ブファミリー（2～7個程度の遺伝子より成る）を、それらのP450遺伝子産物が代謝する薬物により発現が誘導される形態で導入したトランスジェニック動物は報告されていない。

トランスジェニックマウスに限らず、P450遺伝子のノックアウトマウスも開発されてきており、発生や細胞レベルのホメオスタシスへの影響やin vivoでの薬物あるいは化学物質を介した毒性に関するP450の役割について解明する重要なツールとして期待されている (McKinnonら, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 25:783, 1998)。例えば、内因性Cyp1a2のノックアウトマウスは2つの研究グループによって作製された。Pineauらによって作製作製されたCyp1a2ノックアウトマウス (Pineauら, Proc. Natl Acad. Sci. USA., 92:5134, 1995) は、ヘテロでは正常であるが、ホモであると生後すぐに死亡した。一方、Liangらによって作製されたCyp1a2ノックアウトマウスは、ホモ個体の表現型に異常はなかった (Liangら, Proc. Natl Acad. Sci. USA., 93:1671, 1996)。この違いは、欠損させる遺伝子の配列が異なることに起因しているものと考えられる。また、Cyp1a2ノックアウトマウスを用いたP450遺伝子の欠損の影響や代謝の異常についても報告 (例えば、Genterら, Biochem. Pharmacol., 55:1819, 1998) されており、このようなノックアウトマウスを用いたCyp1a2の代謝系での役割が解明されてきている。エタノールを代謝する主要な酵素として知られるCyp2e1についてもノックアウトマウスが作製された (Leeら, J. Biol. Chem., 271:12063, 1996)。Cyp2e1はエタノール以外にも、アセトアミノフェンやアセトン、アラキドン酸の代謝に関与していることが知られているが、Cyp2e1が完全に欠損したホモ個体であっても外見上はワイルドタイプのマウスと変わらなかつたが、アセトアミノフェンに対する耐性が上がり、また、病理所見の結果などからアセトアミノフェンによる肝毒性にCyp2e1による代謝が大きく関与していることが示唆された。これらのP450遺伝子ノックアウトマウスのいずれも、遺伝子ノックアウトによる当該遺伝子の機能解明を目的として作製されたものであり、導入される外来のP450遺伝子の発現レベルの上昇を目的としたものではない。

発明の開示

本発明は、上記のような技術背景に基づき、*in vivo*で薬物の代謝を調べるための改良されたモデル動物、特にヒトP450遺伝子を保持し、ヒト型の薬物代謝を行うモデル動物を提供することを課題とする。

本発明者は、ヒト正常線維芽細胞由来7番染色体の部分断片をミクロセル法によりマウスES細胞（胚性幹細胞）に導入し、それを保持する株を得ることに成功した。また、このES細胞を用いて正常組織においてヒト染色体断片を保持し、薬剤の誘導によって肝臓、小腸においてヒトCYP3A4遺伝子を発現するキメラマウスを得た。さらに、マウス内在性P450遺伝子群を破壊するために、マウス5番染色体上のCyp3a遺伝子群に関する物理的 地図を作製するとともに、その物理的 地図をもとに遺伝子ターゲティングに必要なベクターを作製した。これにより、ヒトP450遺伝子（CYP3Aファミリー）を有し、さらにマウス内在性のP450遺伝子（Cyp3aファミリー）が破壊された、いわゆる遺伝子が置換されたマウスの作製を可能とした。かくして本発明を完成するに至った。

本発明は以下のとおりである。

(1) ヒトチトクロームP450遺伝子の少なくとも一つを保持し、同遺伝子は、同遺伝子産物の基質となる化合物により誘導発現されることを特徴とする非ヒト哺乳動物。

(2) 前記ヒトチトクロームP450遺伝子がCYP3Aファミリーに属するものである(1)の非ヒト哺乳動物。

(3) 前記ヒトチトクロームP450遺伝子は、同遺伝子を含むYACベクター又は同遺伝子を含む染色体断片を用いたミクロセル融合法により導入されたことを特徴とする(1)の非ヒト哺乳動物。

(4) キメラ動物である(3)の非ヒト動物。

(5) (4)の非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物と、(4)の非ヒト動物との交配により得られ、ヒトチトクロームP450遺伝子を含む染色体断片を保持する非ヒト動物。

(6) 前記ヒトチトクロームP450遺伝子のホモログである前記非ヒト哺乳動物固有のチトクロームP450遺伝子が破壊され、その固有の遺伝子の発現が低下又は消失した(1)の非ヒト哺乳動物。

(7) 前記非ヒト哺乳動物固有のチトクロームP450遺伝子の破壊が、Cre-loxPの系を用いて行われたものである(6)の非ヒト哺乳動物。

(8) マウスである(1)～(7)のいずれかの非ヒト哺乳動物。

(9) (1)～(8)のいずれかの非ヒト哺乳動物に由来し、ヒトチトクロームP450遺伝子が発現可能な細胞、又は同細胞を含む器官もしくは組織。

(10) マウスのCyp3a遺伝子群の染色体上の配置を決定するための物理的地図を作製する方法であって、下記の工程を含む方法：

(a) マウスCyp3a遺伝子の各々を特異的に検出できるPCRプライマーまたはハイブリダイゼーション用のプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションにより、マウスBACライブラリーをスクリーニングする工程；

(b) 上記で選択されたBACクローンの末端塩基配列を決定し、同塩基配列に基づいてプライマー又はプローブを作製し、再度BACライブラリーをスクリーニングする操作を数回繰り返して、BACコンティグを作製する工程；及び

(c) 任意のマウスCyp3a遺伝子の全長cDNAプローブを作製し、同プローブを用いて上記BACコンティグに対して穏やかな条件でハイブリダイゼーションを行うことにより、Cyp3a遺伝子クラスターの両端を決定する工程。

(11) (10) の方法により作製でき、マウスCyp3a遺伝子群の染色体上の配置を明らかにした物理的地図。

(12) (11) の物理的地図に基づいてマウスCyp3a遺伝子クラスターの末端のそれぞれに相当するゲノムDNAをクローニングし、得られたクローン化断片のそれぞれを、バクテリオファージP1由来の組換え酵素Creの認識配列であるlox P配列を含むベクター中に挿入することを含む、マウスCyp3a遺伝子群欠損用ターゲティングベクターの作製法。

(13) (12) の方法により作製することができる一対のベクターであって、それぞれのベクターはマウス染色体に組み込まれ、前記酵素Creが存在するときにloxP配列間で相同組換えが起こり、Cyp3a遺伝子クラスター全体を消失させることができることを特徴とする、マウスCyp3a遺伝子群欠損用ターゲティングベクター。

(14) (13) のベクターをマウスの分化多能性を保持する細胞に導入する

工程と、酵素Creを発現させる工程を含む、マウス細胞のCyp3a遺伝子群を欠損させる方法。

(15) (14) の方法により作製することができるマウス細胞であって、Cyp3a遺伝子群を欠損し、かつ、分化多能性を保持する細胞。

(16) (15) のマウス細胞を分化させることを特徴とするCyp3a遺伝子を欠損したノックアウトマウスの作製方法。

(17) (16) の方法により作製されるCyp3a遺伝子群を欠損したキメラマウス又はその子孫。

(18) (17) のキメラマウス又はその子孫と、野生マウスとの交配により得られるCyp3a遺伝子群を欠損したマウス又はその子孫。

(19) (16) のキメラマウスもしくはその子孫又は(17)のマウスもしくはその子孫に由来する組織。

(20) (16) のキメラマウスもしくはその子孫又は(17)のマウスもしくはその子孫に由来する細胞。

(21) (8) のマウス又はその子孫を、(17)のキメラマウスもしくはその子孫または(18)のマウスもしくはその子孫と交配させることにより作製されたマウス又はその子孫であって、ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持し、マウスCyp3a遺伝子群を欠損したマウス又はその子孫。

(22) (8) のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞を培養し、これらが保持するヒトチトクロームP450遺伝子を発現させることによって、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450を産生させ、同ヒトチトクロームP450を回収することを特徴とする、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450の製造方法。

(23) (21) のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞を培養し、これらが保持するヒトチトクロームP450遺伝子を発現させることによって、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450を産生させ、同ヒトチトクロームP450を回収することを特徴とする、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450の製造方法。

(24) (8) のマウスもしくはその子孫又は(21)のマウスもしくはその

子孫の個体、組織又は細胞に薬物を投与することを特徴とする前記薬物の薬理作用及び／または代謝を試験する方法。

また本発明は、少なくともヒトチトクロームP450遺伝子のCYP3A4を保持する非ヒト動物を提供する。本発明は、少なくともヒトチトクロームP450遺伝子のCYP3A4,CYP3A5,CYP3A7を保持する非ヒト動物を提供する。本発明は、ヒトチトクロームP450遺伝子のCYP3Aファミリーの位置するヒト7番染色体断片を保持する非ヒト動物を提供する。さらに本発明は、ヒトチトクロームP450遺伝子のCYP3Aファミリーの位置するヒト7番染色体断片およびヒト14番染色体断片を含むヒト人工染色体、および該人工染色体を保持する非ヒト動物を提供する。

以下、本明細書において、チトクロームP450を単に「P450」ということがある。

以下に、本発明の概要を説明する。

ヒトのP450遺伝子をマウスに導入し、*in vivo*で薬物の代謝を調べるためにには、導入した遺伝子の発現量や組織特異性、酵素誘導のパターンなどは本来その遺伝子がヒトにおいて機能するのと同じく再現される必要がある。導入遺伝子は、できる限り人為的な改変がされておらず、発現調節領域を含んだ大きな単位で導入することが求められる。マウスへの遺伝子導入法としては、これらの要求をみたるものであれば特に制限されない。YACベクターを用いる方法 (Jakobovitsら, *Nature*, 362:255, 1993など) を利用することができる。また、W097/07671に開示された、染色体断片をミクロセル融合によりマウスES細胞に導入してキメラマウスを作製する方法が用いられる。特に好ましいのは、より長大な領域の遺伝子を導入可能な後者の方法（以下、該方法を本明細書では便宜上「ミクロセル融合法」と称する）である。その理由は以下のとおりである。

① 一般に、P450分子種はファミリーごとにクラスターを形成していると考えられている（例えば、Grayら, *Genomics*, 28:328, 1995 ; Hoffmanら, *J. Mol. E* vol., 41:894, 1995）。クラスターを形成している場合、それぞれの遺伝子が少なくとも部分的には共通した機能を有しており、それぞれの機能を互いに補完していることも予測され、単独の遺伝子を導入するよりも、クラスターごと導入することが望ましいと考えられる。ミクロセル融合法は、導入しうる遺伝子の長さ

において有利である。

② P450遺伝子の発現の調節はプロモーターのみならず、P450タンパクをコードする領域の遠位にあるシス作用因子 (*cis-acting element*) の影響を受けることが十分考えられる。前述のラットCyp2B2遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、プロモーター上流19kbp内に含まれる配列が肝特異的なCyp2B2の発現に必要であることが示されており (Ramsdenら, J.Biol.Chem., 268:21722, 1993) 、単に強力なプロモーターと連結したP450遺伝子を発現系に用いることが、生体に近い組織特異性や酵素誘導を再現する手段でないことは明白である。遺伝子がコードされる領域からなるべく遠位の領域まで含めてマウスに導入することにより、ヒトにおける発現調節がマウスにおいても再現されることが期待される。

③ また、前述のRamsdenらの報告では、作製された動物がトランスジェニックマウスであるため、導入した遺伝子が組込まれる位置によってその発現に影響がでたことも考えられる (Wolfら, J. Pharm. Pharmacol., 50:567, 1998)。ミクロセル融合法では、ヒト染色体をホストのゲノムに組み込むことなく独立した状態で細胞に導入できるため、このようなポジショナルエフェクトを回避できる可能性が考えられる。

さらに、トランスジェニック動物を用いた薬物代謝に関するモデル動物は、その動物種のバックグラウンドの影響を受けない物であることが望ましい。例えば、ヒト特異的なP450遺伝子を導入した場合、マウスにおいて本来発現しているマウスのP450によって薬物の代謝様式や毒性の発現についてヒト型への変化が見られないことも有り得る (Wolfら, J. Pharm. Pharmacol., 50:567, 1998)。したがって、ヒトのP450遺伝子をマウスに導入するのであれば、マウス本来が持っているカウンターパートとなる遺伝子、すなわちP450遺伝子のマウスホモログがノックアウトされていることが望ましい。また、重要な遺伝子はその機能を失っても生体に重篤な影響が出ないようにその機能を補完する別の遺伝子が存在していると考えられる。このような遺伝子も併せて導入とノックアウトをマウスで行えば、さらにヒトの状態に近くなるものと考えられる。

本発明の具体的態様のひとつは、ヒトP450遺伝子ファミリーのうちCYP3A遺伝子群の非ヒト哺乳動物への導入に関する。ヒトの場合ではCYP1から4に属するP450が種々の薬物を含む外来性の異物の代謝に関与しているが、その中でもCYP3Aファミリーに属するCYP3A4はヒト肝ミクロソーム中の含量が最も多く、CYP3A4によって代謝される薬物の数は最も多く基質選択性が非常に広い（船江ら、バイオサイエンスとインダストリー、55：81，1997）。

後記実施例に示すように、CYP3A遺伝子群を有するヒト7番染色体あるいはその断片を、W097/07671に記載の方法により導入したキメラマウスを作製した。さらに、好ましい実施態様においては、ヒトのCYP3A遺伝子群を効率良く発現させるため、且つヒト7番染色体上のCYP3A遺伝子群による薬物代謝をよりヒト型にするために、マウス内在性のCyp3a遺伝子群を破壊する。すなわち、ヒト遺伝子の導入を行ったマウスに対して、マウス遺伝子の破壊を行う。あるいはこの逆に、内在性のCyp3a遺伝子群を破壊したマウスにヒト遺伝子の導入を行うことも可能である。さらに、ヒト遺伝子の導入されたマウスとマウス遺伝子の破壊されたマウスの交配により所望のマウスを得ることもできる。

マウス内在性Cyp3a遺伝子群は、マウス5番染色体上に、ヒトCYP3A遺伝子群と同様にクラスターを形成していると考えられている（例えば、D. R. Nelsonら、*Pharmacogenetics*, 6:1, 1996）。少なくとも現在までにCyp3a11, 13, 16（例えば、D. R. Nelsonら、*Pharmacogenetics*, 6:1-42, 1996）とCyp3a25（NCBIデータベースにcDNAの塩基配列のみが報告）の4つの遺伝子が同定されている。マウス内在性Cyp3a遺伝子群を完全に破壊するためには、少なくともこれら4遺伝子を破壊しなくてはならない。従来の遺伝子破壊（ノックアウト）法（例えば、Mansourら、*Nature*, 336:348, 1988）では、これら4遺伝子を個々に破壊しなければならず、少なくとも4回のノックアウト実験を行わなくてはならない。2つ以上の遺伝子を破壊する際に、それら標的遺伝子が物理的に十分離れて染色体上に存在していれば、各々を破壊したノックアウトマウスを作製し、それらを交配させることによって複数遺伝子のノックアウトマウスを作製することが可能と考えられる（例えば、N. Longbergら、*Nature*, 368:856, 1994）。

しかしながら、本発明においては、標的遺伝子であるCyp3a遺伝子群はクラス

ターを形成しているため、減数分裂の際に交叉による染色体の組換えが起こり得る程に、物理的に離れて存在しているとは考え難い。つまり、個々にノックアウトマウスを作製して交配するのではなく、同一のマウスES細胞（例えば、Evansら，*Nature*, 292:154, 1981）中で、少なくとも4回のノックアウト実験を行い、ノックアウトマウスを作製することが必要になる。さらに、破壊すべきCyp3a遺伝子はこれら4遺伝子で十分であるとは限らず、まだ未同定のCyp 3a遺伝子が存在する可能性も考えられる。したがって、まず破壊すべきCyp 3a遺伝子がいくつ存在するかを決定しなくてはならない。そして、その遺伝子の数だけ同一ES細胞中でノックアウトしなければならないことになる。

ES細胞は全ての個体組織に分化する全能性を有する胚性未分化細胞であるが、当然ノックアウト実験によるクローニングの回数が増えれば増えるほど、その全能性が失われ、特に子孫伝達のための生殖細胞系列にES細胞が分化したような有用なキメラマウスが作製できなくなる危険性もある。これらのことから、従来法では本発明におけるマウス内在性Cyp3a遺伝子群の破壊は極めて困難であると考えられる。

近年、バクテリオファージP1由来の組換え酵素Creとその認識配列である34merのloxP配列とを組み合わせた変異マウス作製システムが開発された。このシステムは、主に変異をコンディショナルに行うために用いられてきた（例えば、Gu. Hら，*Science*, 265:103, 1994）。すなわち、ある遺伝子領域を欠失させたい際に、まずloxP配列を相同組換えにより、その遺伝子領域の両端に挿入し、Cre酵素を発現させたときのみにloxP配列間で組換えが起こり、その結果として標的遺伝子領域が欠失するというものである。このときにCre酵素遺伝子を発生時期特異的な遺伝子プロモーター、あるいは組織特異的な遺伝子プロモーターの制御下におくことによって、標的遺伝子を発生のある特異的な時期や特異的な組織で欠失させることができる。さらに、loxP配列間での組換え効率が高いことを利用して、標的遺伝子領域を大きく欠失させることが行われている（例えば、Z-W. Liら，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:6158, 1996）。通常の相同組換えによる遺伝子領域欠失は、その欠失領域が大きくなればなるほどその組換え頻度は低くなり、20 kb程度までの欠失が限界と考えられている。これに対して、Cre-loxP

システムを用いることによって、数百kb位の遺伝子領域の欠失が可能となりつつある。すなわち、一遺伝子のみならず、隣接した数遺伝子をまとめて欠失させることが可能と考えられる。

そこで、本発明においては、前述したようにマウス内在性Cyp3a遺伝子群がクラスターを形成していることから、このクラスターの両端にloxP配列を挿入し、クラスターごと欠失させることを考えた。しかし、Cyp3a遺伝子クラスターがどれ位の大きさで、その両端がどのような遺伝子で構成されているかなどは全く未知であるため、このクラスターの物理地図作製を第一段階として行わなくてはならない。まず、既知のCyp3a11, 13, 16, 25を出発材料として、それらを含む巨大DNAをクローニングし、その両末端をプローブとして、さらに隣接した巨大DNAをクローニングするという、いわゆる染色体ウォーキング（例えば、I. B-Moreauら, *Genomics*, 46:183, 1997）を行い、連続した巨大DNAセット（コンティグ）を作製するという手順をとる。このコンティグ作製には巨大DNAのクローニングが必要であり、従来のシステムでは、大腸菌を宿主としたコスミドや酵母を宿主としたYAC (Yeast Artificial Chromosome) ベクターが用いられてきた。コスミドはそのクローニングキャパシティーが50 kb程度であり、このサイズで数百kbにわたるクラスターの物理地図を作製するには多大な労力を必要とする。

一方、YACベクターは、最大2 Mbもの巨大DNAをクローニングすることができ、染色体レベルでの大まかな物理地図作製に専ら利用されてきた（例えば、S. W. Schererら, *Hum. Mol. Genet.*, 2:751, 1993）。しかし、このようにクローニングキャパシティーが大きいことにより、クローニングの際に全く染色体上の位置が異なるゲノム断片同士がつながってベクターにクローニングされたり（いわゆるYACキメラ）、また、宿主である酵母中で培養している間にYACの一部が欠失したり、組換えが起こることがあり、YACはそれ程安定なわけではない。

他方、近年、宿主中で安定で、クローニングサイズがコスミドとYACの中間であるBAC (Bacterial Artificial Chromosome) のシステムが開発された（例えば、H. Shizuyaら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:8794, 1992）。宿主は大腸菌であり、菌体内でシングルコピーで存在しているF因子プラスミドを基に構築されている。クローニングサイズは最大で300 kb程度、平均で100-120 kbである。

大腸菌内では、シングルコピーで存在し、非常に安定であり、ほとんど通常のプラスミドと同様に扱える。そのため、シークエンス解析を容易に行うことができ、世界的な規模で行われているヒトゲノムプロジェクトにおいて強力なツールとなっている。シークエンシングができるということは、BACクローンの末端シークエンスを基に末端プローブ（STSプライマー）を作製することができ、隣接したBACクローンのスクリーニングを容易に行うことが可能となることを意味する。これらの利点から、本発明におけるマウスCyp3a遺伝子クラスターの物理地図作製には、このBACシステムを用いることが好ましい。

BACシステムを用いた具体的な物理地図作製法として以下の方法が考えられる。まず、Cyp3a11, 13, 16, 25を特異的に検出できるPCRプライマーあるいはハイブリダイゼーション用のプローブを作製し、マウスBACライブラリーをスクリーニングする。得られたBACクローンの末端シークエンスを行い、プライマーあるいはプローブを作製し、再度BACライブラリーをスクリーニングする。このスクリーニングを数回繰り返し、数百kbにわたるBACコンティグを作製する。最後にクラスターの両端を決定するために、任意のCyp3a遺伝子の全長cDNAプローブを作製し、得られたBACコンティグに対して、緩い条件（少なくともCyp 3a11, 13, 16, 25を含むBACクローンは陽性になる条件）でハイブリダイゼーションを行う。このプローブで陽性となるBACコンティグの内、最も外側に位置するBACクローンがクラスターの両端に相当すると考えられる。この方法によって、クラスターの両端が決まってしまえば、そのクラスター内に未知のCyp3a遺伝子がいくつ存在しようとも、まとめて欠失させることができると考えられる。

次に、BACシステムによるマウスCyp3a遺伝子クラスターの物理地図作製後、そのクラスターの両末端に相当するゲノムDNAをクローニングし、実際のターゲティングベクターを作製する。このベクター中には前述したようにloxP配列が含まれており、ES細胞中で相同組換えにより、クラスターの両末端に挿入できる。次にCre発現ベクターをそのES細胞にトランスフェクションすることによって、クラスターの両末端でCre-loxPシステムによる組換えが起こり、結果としてCyp3a遺伝子クラスターが欠失する。数百kbに及ぶと予想されるクラスターの欠失がCre-loxPシステムによって、どの位の効率で起こるかは予測できない。一般的には、

欠失する遺伝子領域が大きければ大きいほど、組換え効率は低いと言われ、本発明における数百kbの欠失効率は決して高いとは期待できないと思われる。そこで、loxP間で組換えが起こった細胞を選択できるポジティブセレクション系を考えなければならない。

近年、A. J. H. Smithら (Nature Genet., 9:376, 1995) はマウスES細胞中で、12番染色体と15番染色体とをCre-loxPシステムを用いて相互に転座させることに成功した。彼らはHprt (ヒボキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスクレラーゼ) 遺伝子欠損ES細胞に対して、Hprt遺伝子の5'側部分 (loxPを含む) と3'側部分 (loxPを含む) とをそれぞれ12番、15番染色体の特定領域に相同組換えにより挿入した。そして、Creを発現させ、loxP間で組換えが起こったときのみにHprt遺伝子が再構成され、そのES細胞はヒボキサンチンを含まない培地 (HA培地) でも増殖できるようになる。この選択法は、Hprt遺伝子欠損ES細胞に対してのみに用いることができ、いかなるES細胞に対しても利用できるわけではない。そこで、本発明においては、いかなるES細胞に対してでも利用できるように以下のような選択法を考えた。

近年、動物細胞への遺伝子導入におけるレポータ遺伝子としてオワンクラゲ由来のGFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子が開発された (例えば、Prasher, D. Cら, Gene, 111:229, 1992)。GFPの発光には基質は必要でなく、蛍光で検出することが可能であるので、生細胞のまま、しかも短時間でモニターすることができる。このことは、ES細胞の全能性を保つという点においても重要であると考えられる。以上の点から、本発明においては、loxP組換え体のポジティブセレクションマーカーとして、GFP遺伝子を用いることとした。具体的には、プロモーターを含まないGFP遺伝子をCyp 3aクラスターの一端に挿入し、残りの一端にはGFPの発現に必要なプロモーターを挿入する。CreによるloxP配列間での組換えが起こると、プロモーターとGFP遺伝子とが連結され、GFPが発現するようになる。この組換えES細胞は蛍光を発光するので、セレクションが可能になる。

得られたES細胞 (Cyp 3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失) からキメラマウスを作製し、野生マウスと交配させ、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失したF1マウスを得る。一方、ヒト7番染色体断片を保持するキメラマウスと野生型マ

ウスを交配させ、ヒト7番染色体断片を保持するF1マウスを得る。このF1マウスとCyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失した上記F1マウスとを交配させ、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失し、かつヒト7番染色体断片を保持するF2マウスを得る。このF2マウスとCyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失したF1マウスとを交配させることによって、最終的なマウス（マウスCyp3a遺伝子クラスターがホモに欠失し、かつヒト7番染色体断片を保持）が得られる。

以下、本発明をさらに詳細に説明する。以下の実施の形態では、非ヒト哺乳動物としてマウスについて説明するが、本発明はマウスに限定されるものではない。

ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体またはその断片を、自己の染色体上に発現可能な形態で保持し、さらにカウンターパートであるマウス内在性P450遺伝子群を欠損したマウス個体は、

- (1) 標識されたヒトP450遺伝子を含む染色体またはその断片を保持する染色体供与細胞の作製、
- (2) 分化多能性を保持するマウス細胞へのミクロセル法によるヒト染色体またはその断片の移入、
- (3) 上記マウス細胞を用いたキメラマウスの作製、
- (4) キメラマウスにおけるヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体の保持および、ヒトP450遺伝子の発現の確認、
- (5) マウス内在性P450遺伝子群の物理的地図の作製、
- (6) 上記物理的地図をもとにしたノックアウトベクターの作製、
- (7) 分化多能性を保持するマウス細胞における遺伝子ターゲティング、
- (8) 上記マウス細胞を用いたノックアウトマウスの作製、
- (9) ノックアウトマウスにおけるマウスP450遺伝子群の欠損の確認、及び
- (10) ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持するマウスと、マウス内在性P450遺伝子群を欠くマウスの交配、

の経過を経ることにより得ることができる。

このような過程を経て、ヒトP450遺伝子又はP450遺伝子群が導入されたマウス、あるいは、さらに、マウス内在性P450遺伝子群を欠失したマウスを、「ヒトP450

遺伝子導入マウス」ということがある。

以下、ヒトP450遺伝子導入マウスの作製法の例を、各工程毎に詳述する。

(1) 標識されたヒトP450遺伝子を含む染色体またはその断片を保持する染色体供与細胞の作製

染色体供与細胞としては、1) 受容細胞で選択可能なマーカーで標識されたヒト染色体を保持し、2) それ以外のヒト染色体を含まない、3) ミクロセル形成能が高い細胞が望ましい。

ヒト染色体提供の材料としては、ヒト由来のあらゆる細胞株、癌細胞、初代培養細胞を用いることができるが、染色体の欠失、增幅等の異常の可能性が低く、また培養が容易な点を考慮すると正常線維芽細胞が適している。

まず、1) については、ヒト細胞は、薬剤（G418、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、プラストサイシン）耐性等のマーカー遺伝子を発現するベクターにより形質転換することができる。ここで用いるマーカー発現制御のためのプロモーターとしては、ヒト細胞においてのみならず、マウスES細胞のような受容細胞で効率よく働くものが望ましい。この目的には、SV40エンハンサーと単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼプロモーターを連結したものの（Katohら, Cell Struct.Funct., 12:575, 1987）、マウスPGK-1プロモーター（Sorianoら, Cell, 64: 693, 1991）等を用いることができる。

上記マーカー遺伝子、必要に応じてプロモーターを連結したマーカー遺伝子を含むDNA断片で、エレクトロポーリーション（石田ら, 細胞工学実験操作入門、講談社、1992）等によりヒト細胞を形質転換し、マーカー遺伝子が発現する細胞を選択することにより、導入されたマーカー遺伝子が、23種46本あるヒト染色体上にランダムに挿入されたようなヒト細胞形質転換体のライブラリーを得ることができる。

3) については、多くのヒト正常細胞はミクロセル形成能が非常に低いので、上記の形質転換体をミクロセル形成能の高い細胞、例えば、マウスA9細胞（Oshimura, M., Environ. Health Perspect., 93:57, 1991）と全細胞融合することにより、ミクロセル形成能を付与することができる。マウスヒト雑種細胞では、

ヒト染色体が選択的に消失することが知られているが、ここで得られた融合株は、先述のマーカーで選択することにより、マーキングされたヒト染色体を安定に保持することができる。

さらに、2) の条件を満たすために、この細胞融合株からミクロセルを取得し、マウスA9細胞と再度融合することが望ましい。この場合もヒト染色体上のマーカーで選択することにより、得られるミクロセル融合株の多くは1)、2)、3) の条件を満たしたものであると考えられる。マーキングされたヒト染色体の同定は、最終段階で得られるマウス-ヒトモノクロソーム雑種細胞においてPCR（ポリメラーゼチェインリアクション、Sakakiら、*Science*, 239:487, 1988）、サザンプロット解析（Ausubelら、*Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1994）、FISH（フルオレッセンス・インサイチュ・ハイブリダイゼーション、Lawrenceら、*Cell*, 52:51, 1988）解析等により調べることができる。

ヒトP450遺伝子を含む染色体の導入を行う場合には、多くのヒト細胞形質転換体クローニングについて、それぞれ上記の過程を繰り返して目的染色体がマーキングされたものを探す。あるいは、ヒト細胞形質転換クローニングの混合物について上記の過程を実施し、得られる多数のマウス-ヒトモノクロソーム雑種細胞についてヒトP450遺伝子を含む染色体の同定を行ってもよい。さらに、ヒトP450遺伝子を含む染色体上のDNA配列を標的とした相同組換え（Thomasら、*Cell*, 51:503, 1987）により、特定の部位にマーカー遺伝子を挿入することも可能である。

マウス-ヒト雑種細胞から調製したミクロセルにガンマ線を照射することにより、マーキングされたヒトP450遺伝子を含む染色体を断片化して、マウスA9細胞に導入することもできる。また、ミクロセルにガンマ線を照射しない場合でも、ある割合で部分断片化したヒトP450遺伝子を含む染色体が移入されることがある。これらの場合、得られるミクロセル融合株は、マーキングされたヒトP450遺伝子を含む染色体の部分断片を保持している。これらは、受容細胞にヒトP450遺伝子を含む染色体の部分断片を導入したいときに用いることができる。

マウスES細胞等の受容細胞に導入されるヒト染色体には、目的とするチトクロームP450遺伝子の導入が可能である限り、欠失、転座、置換、逆位、倍加などの

様々な改変を施し得る。従来は、富塚ら (*Nature Genet.*, 16:133-143, 1997) が作製したヒト抗体産生マウスのように、偶発的に断片化したヒト染色体断片やヒト染色体全長そのものがマウスへの導入に使われていた。このように、偶発的に断片化したヒト染色体断片やヒト染色体全長を用いる場合、導入されるヒト染色体によっては、マウス中で不安定であったり、あるいは、ヒト染色体上の遺伝子がマウスの発生に影響を及ぼし、ヒト染色体導入マウス自体が生まれてこないといった問題に直面する可能性も考えられる。したがって、あらゆるヒト染色体断片を安定に保持するようなマウスを将来的に作製していくためには、偶発的に生じた染色体断片ではなく、目的に適うようにヒト染色体を所望の部位で切断したり、所望の染色体断片のみを別の安定な染色体につなげるなどといった自由自在に染色体を加工する技術が望まれる。このような技術は、染色体工学と呼ばれ、主にマウスES細胞中で内在性マウス染色体を部位特異的に切断したり (WO 98/54348) 、相同染色体間で組換え（転座）を起こさせることで特定の遺伝子領域を欠失・逆位・倍加させ、そのような改変染色体を有する変異マウスの作製に利用されてきた (R.Ramirez-Solisら、*Nature* 378:720, 1995)。一方、このような様々な人工的改変を施されたヒト染色体を保持するマウスなどの非ヒト動物の作製は報告がない。

そこで、本発明において、ヒト7番染色体上のCYP3A遺伝子群をマウス中で安定かつ効率良く発現させるために、ヒト7番染色体断片を保持するヒト人工染色体（以下、「#7-HAC」と呼ぶ）の構築を開示する。この#7-HACの構築は、例えば、以下に示す過程によって実施され得る（図12参照）。

(i) ヒト7番染色体の改変

ヒトCYP3A遺伝子クラスターは、7番染色体上の7q21-22に存在する（例えば、B.A.Brooksら、*Am.J.Hum.Genet.*, 43:280, 1988）。この染色体領域周辺のみを人工染色体作製に用いるために、まず、CYP3A遺伝子クラスターの極テロメア側に位置する染色体部位（例えば、ARC41など）にヒトテロメア配列を相同組換えにより挿入し、テロメアトランケーション（例えば、黒岩ら、*Nucleic Acid Research* 26:3447, 1998）することで切断する。

ところで、CYP3A遺伝子クラスターを含むヒト7番染色体断片は、さらにMDR遺伝子クラスター(PGY1,3)を含むものであってもよい。CYP3A遺伝子クラスターの極セントロメア側にMDR遺伝子クラスター(PGY1,3)が存在する(NCBIデータベース)。MDR1遺伝子は薬物の細胞外排出に関わる遺伝子(例えば, Juliano, R. L.ら、*Biochemi.Biophys. Acta.* 455:152, 1976)であり、特定の薬物に対して種差があることが報告されている(例えば, Lecureur V.ら、*Carcinogenesis*, 17:1157, 1996)。CYP3A4の基質の大部分がMDR1の基質であるため(例えば、Schuetz. EGら、*Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, 93:4001, 1996)、ヒト型薬物代謝モデル動物作製において、ヒトCYP3A遺伝子クラスターに加えてMDR遺伝子クラスターも併せて導入することがより有用であると考えられる。そこで、MDR遺伝子クラスターの極セントロメア側に位置する染色体部位(例えば、AC004082 NCBIデータベース)に組換え酵素Creの認識配列であるloxP配列を相同組換えにより挿入し、MDR-CYP3A断片のみを人工染色体作製に用いる。また、P450遺伝子と同様、MDR遺伝子においても宿主動物側の相同遺伝子が欠損あるいは不活性化されていることが望ましい。マウスにおいてはMdr1aおよびMdr1b遺伝子ノックアウトの事例が報告されており(Schinkelら、*Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.*, 94:4028, 1997; Schinkelら、*Cell*, 77:491, 1994)、これらの論文に記載された方法に従ってMdr遺伝子欠損マウスを作製しうる。Mdr遺伝子欠損マウスを前述の交配計画に組み込むことにより、マウスCyp3a遺伝子クラスターと、マウスマdr1aおよび/またはMdr1b遺伝子がホモに欠失し、かつヒトCYP3A遺伝子クラスターとヒトMDR遺伝子クラスターを含む染色体断片を保持するマウスが得られる。

(ii) ヒト14番染色体断片SC20の改変

富塚ら(*Nature Genet.*, 16:133-143, 1997)の作製したヒト抗体産生マウスにおいて、ヒト14番染色体断片SC20は、マウス中においてほぼ100%保持され、かつ子孫伝達することが示されている(WO98/37757)。そこで、本発明において、このSC20をヒト人工染色体ベクターとして用いることを考える。つまり、上記(i)で記したCYP3Aヒト7番染色体断片をSC20へ転座させることでヒト7番染色体断片を保持するヒト人工染色体#7-HACを構築する。14番染色体上の14p12に位置

するRNR2遺伝子座にloxP配列を相同組換えにより挿入し、Cre-loxPシステム（例えば、R.Ramirez-Solisら、Nature, 378:720, 1995）を用いることで、CYP3Aヒト7番染色体断片をSC20上のRNR2遺伝子座に転座させる。

上記(i)、(ii)で記した相同組換えを効率良く行うためのホスト細胞として、ニワトリDT40細胞（理研セルバンク：RCB1464、ATCC：CRL-2111）を利用する考えられる（例えば、Diekenら、Nature Genet., 12:174, 1996）。以下、DT40細胞を用いる例について説明するが、ES細胞でも効率はDT40細胞に比べて低いが、相同組換えは可能である。

(iii) Cre-loxPシステムによるCYP3Aヒト7番染色体断片のSC20上への転座

上記(i)、(ii)に示すようにして得られた改変ヒト7番染色体断片と改変SC20のそれぞれを保持するDT40細胞を作製する。次に、Cre-loxPシステムを用いてCYP3Aヒト7番染色体断片をSC20上へ転座させるために、それぞれの改変ヒト染色体断片を保持するDT40細胞を融合させることによって、2本の改変ヒト染色体断片を保持するDT40細胞ハイブリッドを作製する。これで、転座のための材料が揃ったことになる。

次に、Cre組換え酵素をこのDT40細胞ハイブリッド中で発現させて転座させるわけであるが、2本の非相同染色体間での組換え（転座）頻度は非常に低いことが報告されており（例えば、A.J.Smithら、Nature Genet., 9:376, 1995）、さらに本発明の場合は、内在性染色体間ではなく、外来性のヒト染色体間での転座であるため、さらに組換え効率が低くなる可能性も考えられる。そこで、期待通りloxP間で組換えが起こった細胞を選択できるポジティブセレクション系を考えることが好ましい。そこで、本発明の好ましい態様においては、内在性マウスCyp3a遺伝子クラスターの欠失の項でも述べたように、loxP間で染色体の転座が起こった細胞においてGFP遺伝子が発現し、FACSでソーティングすることによって目的の細胞をクローニングするシステムを用いる。さらに、組換え頻度を上げるために、Cre組換え酵素を一過性ではなく、安定発現させる。2本の染色体間での転座は相互的に起こるので、Cre組換え酵素を安定発現させると、せっかく転座を起こした染色体が、頻度こそは低いが、再び組換え（転座）を起こして元に

戻ってしまう可能性がある。そこで、通常このような実験においてはCre組換え酵素を一過性に発現させたり、Cre組換え酵素の発現を厳密にコントロールしたりする。しかし、本発明においては、DT40ハイブリッド中で転座させた直後に目的の転座したヒト人工染色体をミクロセル融合法によりチャイニーズハムスターCHO細胞へ移入させるため、CHO細胞においては、Cre組換え酵素の影響は受けずに済む。そこで、単純にCre組換え酵素を安定発現させることが可能となる。

上記(i)、(ii)、(iii)で開示したように、ニワトリDT40細胞中でテロメアトランケーションとCre-loxPシステムによる染色体間転座を用いることによって、如何なるサイズのヒト染色体断片(YACベクターのクローニングサイズを越える)をも安定なSC20染色体ベクター上のloxP部位(14p12)にクローニングすることができ、ヒト人工染色体構築システムが提案される。

上記のヒト人工染色体構築システムにより作製された#7-HACは、マウスES細胞に導入される前に、チャイニーズハムスターCHO細胞に導入されるべきである。Diekenら(Nature Genet., 12:174, 1996)は、改変ヒト染色体をニワトリDT40細胞からマウスMEL細胞(ガン細胞の一種)へ移入したが、大部分が断片化された状態で移入された。本発明者らも、ニワトリDT40細胞からマウスA9細胞などへヒト染色体の移入を試みたが、全てヒト染色体の断片化が観察され、無傷の状態で移入されることはなかった。しかしながら、チャイニーズハムスターCHO細胞へ移入した際にのみ、無傷の状態でヒト染色体を移入し得ることを発明者らは初めて見出した。そこで、後記実施例では、ヒト人工染色体構築システムにより作製された#7-HACは一度CHO細胞へ移入することとした。CHO細胞はマウスA9細胞と同様に効率良くミクロセルを形成することが知られており(例えば、M.Koiら、SCIENCE 260:361, 1993)、これにより改変ヒト染色体をCHO細胞からマウスES細胞へ移入し、#7-HAC保持キメラマウスを作製することができると考えられる。以上の手順の概略を、図16に示す。

(2) 分化多能性を保持するマウス細胞へのヒトP450遺伝子を含む染色体またはその断片の移入

これまでに、種々の系統のマウス由来の胚性癌腫細胞(EC細胞、Hanaokaら、D

ifferentiation, 48:83, 1991)、胚性幹細胞（ES細胞、Evansら, Nature, 292: 154, 1981）、胚性生殖細胞（EG細胞、Matsuiら, Cell, 70:841, 1992）を、マウス初期胚に注入あるいはマウス初期胚と共に培養することにより、未分化な状態の前記の種々の細胞が分化して様々な形態あるいは機能を有する体細胞に変化（分化）すること、すなわちキメラマウス作製が可能であることが報告されている。ES、EG細胞はその能力が特に高く、多くの場合生殖細胞にも寄与し、その細胞由来の子孫を作ることができる。EC細胞は主に生殖細胞癌から、ES細胞は胚盤胞の内部細胞塊から、EG細胞は発生初期に出現する原始生殖細胞から得られる。本発明におけるヒトP450遺伝子を含む染色体移入の受容細胞としては、これらの細胞株およびその変異株、さらにはマウス個体において全てのあるいは一部の正常体細胞に分化可能なあらゆる未分化細胞を用いることができる。

受容細胞へのヒト染色体移入の材料としては、(1) 得られたヒトP450遺伝子を含む染色体供与細胞から調製されるミクロセルあるいはガンマ線照射したミクロセルを用いることができる。受容細胞への移入は、(清水素行, 細胞工学ハンドブック, 羊土社, 1992) 等に記載された方法で受容細胞とミクロセルを融合することにより行う。ミクロセル供与細胞においては、ヒトP450遺伝子を含む染色体またはその断片が受容細胞において選別可能なマーカーを保持している。この中から、(1) と同様にPCR、サザンプロット解析、FISH解析等により、ヒトP450遺伝子あるいはヒトP450遺伝子を含む染色体あるいはその断片を保持する株を選択すれば、ヒトP450遺伝子を含む染色体あるいはその断片を導入することが可能である。また、異なる選択マーカーを保持する複数のヒトP450遺伝子を含む染色体あるいはその断片を逐次導入することにより、これらを同時に保持する受容細胞を得ることもできる。

ヒトP450遺伝子を含む染色体上のマーカー (G418耐性等) により選抜された受容細胞が、供与細胞の保持していたヒトP450遺伝子を含む染色体あるいはヒトP450遺伝子の全部あるいは一部を保持していることは、以下のようにして確認される。選抜された受容細胞から抽出したゲノムDNAを用い、プローブとしてヒト特異的繰り返し配列 (L1、Alu等、Korenbergら, Cell, 53:391, 1988)、ヒト染色体特的プローブ (Lichterら, Human Genetics, 80:224, 1988) を用いたフルオ

レッセンス・インサイチュ・ハイブリダイゼーション（FISH）等の染色体解析、ヒトP450遺伝子特異的プライマーによるPCR法、ヒトP450遺伝子特異的配列プローブを用いたサザン解析により検出される。

(3) ヒトP450遺伝子を含む染色体導入マウス細胞からのキメラマウス作製

(2)で得られたES細胞株等のマウス細胞株からのキメラマウス作製は、（相澤慎一、バイオマニュアルシリーズ8ジーンターゲティング、羊土社、1995）等に記載された方法で行う。効率的なキメラマウス作製を行うための宿主胚の発生時期、系統等の選択については、それぞれのES細胞株についてすでに検討された条件を用いることが望ましい。例えば、CBA×C57BL/6 F1由来のTT2細胞（野生色、Yagiら、Analytical Biochemistry, 214:70, 1993）についてはBalb/c（白色、日本クレア社）あるいはICR（日本クレア社）由来の8細胞期胚を宿主胚として用いることが望ましい。

(4) キメラマウスにおけるヒトP450遺伝子群を含む染色体の保持およびヒト遺伝子発現の確認

ES細胞を注入した胚から誕生したマウスにおけるES細胞の貢献率は、その毛色によりおおまかな判定ができる。しかし、毛色に貢献がみられないからといって他の組織で貢献がないと判断はできない。より詳細なキメラマウス各組織におけるヒト染色体の保持は、各組織より抽出されたゲノムDNAを用いたサザン解析、PCR等によって確認することができる。

導入された染色体上のヒトP450遺伝子の発現は以下のようにして確認される。ヒトP450遺伝子を含む染色体由来のmRNAの発現は、各組織由来のRNAを用いたRT-PCR法（Kawasakiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5698, 1988）、ノーザンプロット法（Ausubelら、前記）により検出される。タンパク質レベルの発現はウェスタンプロット法（Ausubelら、前記）あるいは、キメラマウス肝ミクロソームを用いたテストステロン 6β 水酸化活性測定等により検出される。さらに、キメラマウス細胞中でのヒトP450遺伝子群を含む染色体の保持および該染色体上の遺伝子の発現が、キメラマウス由来初代培養細胞での薬剤耐性マーカー遺伝子発現による耐性細胞の出現により確認できる。

キメラマウスにおいてヒトP450遺伝子群を含む染色体を保持するES細胞が、そのキメラマウスの生殖細胞に分化した場合、その子孫にも導入したヒトP450遺伝子群を含む染色体またはその断片が認められ、その染色体または断片上の遺伝子を発現する。

(5) マウス内在性P450遺伝子群の物理的 地図の作製

導入したヒトP450遺伝子群のカウンターパートとなるマウス内在性P450遺伝子群（Cyp3aクラスター）を欠損させたマウスを作製するためには、クラスター内の各Cyp3a遺伝子の配列順序、すなわち、物理的 地図を決定する必要がある。このような物理的 地図の作製には、プラスミドのようなクローニングサイズが小さいものは不適切で、巨大なDNAをクローニングできるシステムが必要不可欠である。このような目的のために、従来までは、クローニングサイズが40 kb位のコスミドや最大2 MbまでのDNAをクローニングできる酵母人工染色体であるYAC（例えば、S. W. Schererら, *Human Molecular Genetics*, 2:751, 1993）ベクターを用いた物理的 地図の作製が行われてきた。コスミドベクターを用いることによって、そのクローニングサイズの小ささから精度の高い地図を作製することが可能である。一方、YACベクターを用いることで、染色体レベルでの広範囲にわたる大まかな地図を作製することが可能である。あるいは、最近、この両者の中間のクローニングサイズ（100-300 kb）を持つバクテリア人工染色体BAC（H. Shizuyaら, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89:8794, 1992）ベクターが開発されたが、これを用いることも可能である。BACベクターは挿入DNAの末端シークエンスが容易にできるという点で、染色体ウォーキングやゲノムの大規模シークエンスなどに威力を発揮している。これらのベクターシステムを利用して、染色体上のマウス内在性Cyp3aクラスターの物理的 地図を作製することができる。

例えば、BACベクターを用いた物理的 地図の作製は以下のようにしてできる。マウスCyp3a遺伝子の各々（Cyp3a11, 13, 16と25）を特異的に検出できるPCRプライマーあるいはハイブリダイゼーション用のプローブを作製し、市販のマウスBACライブラリーをスクリーニングすることができる。得られたBACクローンの末端シークエンスを行い、プライマーあるいはプローブを作製し、再度BACライブ

ラリーをスクリーニングする。この末端シークエンス及びスクリーニングを数回繰り返すことによって、数百kbにわたるBACコンティグを作製できる。最後にクラスターの両端を決定するために、任意のマウスCyp3a遺伝子の全長cDNAプローブを作製し、得られたBACコンティグに対して、緩い条件でハイブリダイゼーションを行う。この条件は、少なくとも現在までに同定されているCyp3a11, 13, 16と25の4遺伝子のいずれかを含むBACクローンはすべて陽性になることが望ましい。このプローブで陽性となるBACクローンの内、最もコンティグの外側に位置するクローンがクラスターの両末端に相当することになり、クラスターの物理的地図を完成させることが可能となる。あるいは、ゲノムプロジェクトで行われているように、このBACコンティグの全シークエンスを決定することによっても達成することができる。

(6) 上記物理的地図をもとにしたターゲティングベクターの作製

BACシステムによるマウスCyp3a遺伝子クラスターの物理地図作製後、そのクラスターの両末端に相当するゲノムDNAをクローニングし、実際のターゲティングベクターを作製することが可能である。このベクター中には、前述したようにloxP配列が含まれており、ES細胞中で相同組換えにより、クラスターの両末端に挿入できる。次に、Cre発現ベクターをそのES細胞にトランスフェクションすることによって、クラスターの両末端でCre-loxPシステムによる組換えが起こり、結果としてCyp3a遺伝子クラスターを欠失させることができる。

同様なシステムとして、酵母のFLP/FRTシステム（例えば、S. Jungら, Science, 259:984, 1993）を利用することもできる。数百kbに及ぶと予想されるクラスターをCre-loxPシステムによって欠失させる場合、その欠失がどの位の効率で起こるかは予測できない。そこで、loxP間で組換えが起こった細胞を選択できるポジティブセレクション系として、例えば、GFP遺伝子の発現をマーカーとすることができます。具体的には、プロモーターを含まないGFP遺伝子をCyp3aクラスターの一端に挿入し、残りの一端にはGFPの発現に必要なプロモーターを挿入する。CreによるloxP配列間での組換えが起こると、プロモーターとGFP遺伝子とが連結され、GFPが発現されるようになる。このような組換えES細胞は蛍光を発光する

ので、セレクションが可能になる。

他のセレクションマーカーとして、ある種の薬剤耐性遺伝子を用いることも可能である。この場合、Cre-loxP組換えの結果、薬剤耐性遺伝子が発現し、その薬剤を含んだ選択培地内で組換えES細胞をセレクションすることができる。いずれにせよ、セレクション法としてES細胞の全能性になるべく影響を与えないものが望ましい。

(7) 分化多能性を保持するマウス細胞における遺伝子ターゲティング

分化多能性を保持するマウス細胞、例えば、ES細胞に(6)で作製されたターゲティングベクターを導入する。その際、エレクトロポレーションなどの、ES細胞に遺伝子を導入するために確立された〈相澤慎一、バイオマニュアルシリーズ8ジーンターゲティング、羊土社、1995〉等に記載された条件で行うのが望ましい。先述のように、クラスターごと遺伝子を欠損させるためにCre-loxPシステムを利用するのであれば、クラスターの上流と下流にloxP配列を導入することに、PCR、サザン解析などで、相同組換えが起こっていることを確認するとともに、ES細胞が分化多能性を有しているか確認することが望ましい。すなわち、それぞれのベクターを導入し相同組換えによって得られたloxP配列をゲノム内に持つESクローニングを用いてキメラマウスを作製し、その作製効率を検討する。Cre酵素を発現するベクターについても同様に、マウス内在性Cyp3a遺伝子のクラスターの両端に1loxP配列を保持するES細胞へエレクトロポレーションなどにより導入を行う。

Creはマウスゲノム内に必ずしも組込まれる必要はなく、一時的に発現するようなプロモーターあるいはベクター構造でもよい。最終的にCyp3a遺伝子がクラスターとして欠損したES細胞のセレクションには、PCR、サザン解析といった、遺伝子を直接的に解析する方法だけでなく、GFPなどのレポーター遺伝子を用いたセレクションを併用すると便利である。

(8) 上記マウス細胞を用いたノックアウトマウスの作製

ノックアウトマウスの作製については先述の(3)の方法と同様である。

(9) ノックアウトマウスにおけるマウスP450遺伝子群の欠損の確認

作製されたノックアウトマウスにおけるES細胞の貢献率は、ヒト染色体導入キメラマウスと同様にその毛色によっておおよその判断ができる。さらに、ノックアウトマウスより抽出したゲノムDNAを用いたサザン解析、PCR等により内在性遺伝子の欠損を確認することが望ましい。また、ターゲティング部分にGFPを挿入した場合は、マウス個体においても発現が認められるため、ES細胞におけるセレクションと同様に、蛍光によって、容易にノックアウトマウスの選別が可能となる。

(10)ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持し、マウス内在性P450遺伝子群を欠くマウスの作製

ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持し、マウス内在性P450遺伝子群を欠くヒトP450マウスは、先述の方法によって作製された、ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持するキメラマウスあるいはその子孫と、内在性マウスP450遺伝子をクラスターごと欠損させたキメラマウスあるいはその子孫を交配することにより得られる。「ヒト染色体の保持」、「内在性P450遺伝子の欠損」は共に、基本的にメンデルの法則に従って両者の遺伝的要素が伝達すると考えられる。マウスの交配方法には種々のパターンが考えられるが、具体的には以下のように実施可能である。まず、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失したキメラマウスを野生マウスと交配させ、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失したF1マウスを得る(F1マウスA)。一方、ヒト7番染色体断片を保持するキメラマウスと野生型マウスを交配させ、ヒト7番染色体断片を保持するF1マウスを得る(F1マウスB)。F1マウスAとF1マウスBを交配させ、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失し、かつヒト7番染色体断片を保持するF2マウスを得る。このF2マウスとF1マウスAとを交配させることによって、最終的なマウス(マウスCyp3a遺伝子クラスターがホモに欠失し、かつヒト7番染色体断片を保持)が得られる。

また、マウス内在性P450遺伝子欠損マウスは、ホモ個体を作製し、これを用いるよりも、ヘテロ個体を交配のために用いる方が良い。なぜなら、ノックアウトマウスにおける遺伝子欠損ホモ個体は、しばしば致死性であることが報告されており、胎児期、新生時期に死亡してしまう可能性が考えられるためである。

上記のようにして得られるキメラマウスを利用して生物学的に活性のあるヒトP450タンパクをその器官、組織、細胞から得ることができる。例えば、キメラマウスあるいはその子孫の肝ミクロソームからヒトP450を含む分画を抽出し、精製することでヒトのP450タンパクを抽出できる。あるいは、ヒトP450遺伝子を含む染色体を保持するキメラマウスあるいはその子孫の組織から細胞株を樹立し、培養することでその培養物からヒトP450タンパクを回収することが可能である。また、得られたキメラマウスあるいはその子孫あるいはそれらとマウス内在性P450遺伝子群を欠損させたノックアウトマウスとを交配させてできたヒトP450導入マウスは、その体内で本来ヒトの生体内で発現しているのと同じパターンでヒトP450を発現していると考えられるため、特定の薬物を投与することで個体レベルでの薬理効果、毒性、薬物動態を研究するための実験動物としての利用価値が高い。さらに、ヒトにおける薬物の代謝メカニズムや組織ごとの毒性について、薬物をヒトに投与することなく知ることができる。

図面の簡単な説明

図1は、リファンビシン投与キメラマウスの肝臓由来のRNAを用いたRT-PCRの電気泳動写真である。リファンビシンを投与したキメラマウスの肝臓でヒトCYP3A4が発現していることが示されている。

①、⑥：マーカー

②：リファンビシン投与マウス肝由来のPCR産物をEcoRI処理したもの

③：ヒト肝由来RNAのPCR産物をEcoRI処理したもの

④：リファンビシン投与マウス肝由来のPCR産物

⑤：ヒト肝由来RNAのPCR産物

図2は、リファンビシン投与キメラマウスの各種臓器におけるヒトCYP3A4の発現を調べた結果を示す電気泳動写真（RT-PCR）である。肝臓および小腸でヒトCYP3A4が発現していることを示す。

①、⑧：マーカー

②：肝臓

③：小腸

④：腎臓

⑤：脾臓

⑥：肺

⑦：心臓

図3は、マウスCyp3a11,13,16,25を含むBACクローンのコンティグ作製を示す。

図4は、Cyp3a遺伝子クラスターの両端にloxP配列を挿入するためのカセットベクターploxPUP、ploxPDOWNの構造を示す図である。

図5は、マウスCyp3a領域へのターゲッティングのスキームを示す。

図6は、マウスCyp3a遺伝子クラスターを欠失させるためのターゲティングベクターploxP3aUPの構造を示す図である。

図7は、マウスCyp3a遺伝子クラスターを欠失させるためのターゲティングベクターplox3aDOWNの構造を示す図である。

図8は、ヒト染色体上にloxP配列を挿入するためのカセットベクターploxPHyg、ploxPbsrの構造を示す図である。

図9は、ヒト7番染色体上のCOL1A2遺伝子座に位置するゲノム領域(COL1A2)にloxP配列を挿入するためのターゲティングベクターpBSCOL1A2lox(F)、pBSCOL1A2lox(R)の構造、及び相同組換え体の同定を示す図である。

図10は、ヒト染色体上にヒトテロメア配列を挿入するためのカセットベクターpTELPuroの構造を示す図である。

図11は、ヒト7番染色体上のCYP3A遺伝子座クラスターに位置するゲノム領域(AF006752)にヒトテロメア配列を挿入するためのターゲティングベクターpTEL Puro5.3(F)、pTELPuro5.3(R)の構造、及び相同組換え体の同定を示す図である。

図12は、ヒト7番染色体上の遺伝子及び多型マーカーの存在、及びヒト人工染色体#7-HACの構築を示す図である。

図13は、ヒト14番染色体上のRNR2遺伝子座にloxP配列を挿入するためのターゲティングベクターpRNR2loxPbsrの構造、及び相同組換え体の同定を示す図である。

図14は、Cre組換え酵素安定発現ベクターpBS185hisDの構造を示す図である。

図15は、ヒト7番染色体断片の14番染色体断片SC20への部位特異的転座の検出を示す図である。

図16は、#7-HACを保持するキメラマウスの作製の概略を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1 ヒト7番染色体断片を保持するマウスA9細胞のスクリーニング

(1) ヒト染色体を保持するマウスA9細胞ライブラリーの作製

様々なヒト染色体を保持するマウスA9細胞ライブラリーを、W097/07671に記載の方法に従って調製した。具体的には以下に示すようにして行った。

G418耐性遺伝子を含むプラスミドpSTneoB (Katohら、Cell Struct. Funct., 1 2:575, 1987; Japanese Collection of Research Biologicals(JCRB), Deposit Number: VE039) を制限酵素SalI (宝酒造) で線状化し、ヒト正常纖維芽細胞HFL-1(RIKEN Cell Bankより入手、RCB0251)へ導入した。HFL-1細胞をトリプシン処理し、 5×10^6 個/mlとなるようにダルベッコのリン酸バッファー(PBS)に懸濁してから $10 \mu\text{g}$ DNA存在下でジーンバルサー(バイオラッド)を用いてエレクトロポレーションを行なった(石田ら、細胞工学実験操作入門、講談社, 1992)。 $25 \mu\text{F}$ の容量で1000Vの電圧を4mm長のエレクトロポレーションセル(165-2088、バイオラッド)を用いて室温で印加した。エレクトロポレーションした細胞を15%牛胎児血清(FBS)を添加したイーグルF12培地(以下F12、という)を含む100mm組織培養用プラスチックシャーレ(コーニング)3~6枚に播種した。1日後に $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のG418(GENETICIN, シグマ)を含む15%FBSを添加したF12培地と置き換えた。2~3週間後に生じたコロニー100個程度を一つの集団として52グループにそれぞれまとめ、100mmシャーレに再び播種し培養した。

マウスA9細胞(Oshimura, Environ. Health Perspect., 93:57, 1991, JCRB0211)を10%牛胎児血清(FBS)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(以下DM

EM、という)中、100mmシャーレで培養した。52グループのG418耐性HFL-1 細胞を15%牛胎児血清(FBS)と200 μ g/mlのG418を添加したF12中で、それぞれ100mmシャーレで培養した。マウスA9細胞とHFL-1 細胞をトリプシン処理後それぞれ四分の一から半分量ずつ混合し、100mmシャーレに播種し10%牛胎児血清(FBS)を添加したDMEMと15%牛胎児血清(FBS)を添加したF12との等量混合物中で半日から一日培養した。細胞融合は(清水ら、細胞工学ハンドブック、羊土社、p.127-, 1992)に記述されている方法に従った。DMEMで細胞表面を2回洗った後、2mlのPEG(1:1.4)溶液で1分間処理し、さらに、2mlのPEG(1:3)溶液に換え1分間処理した。PEG溶液を吸い取り、無血清培地(DMEM)で3回洗った後、通常の培地(10%FBS、DMEM)で1日間培養した。細胞をトリプシン処理により分散し、ウワバイン(1×10^{-5} M、シグマ)およびG418(800 μ g/ml)を含む二重選択培地(10%FBS、DMEM)に懸濁し、100mmシャーレ3枚に播種した。約3週間培養した後、生じたコロニーをトリプシン処理により細胞を分散しG418(800 μ g/ml)を含む選択培地(10%FBS、DMEM)で培養した。

トリプシン処理により細胞を分散し2グループを一つにまとめて、6本の25cm³遠心用フラスコ(コースター、3025)にて細胞密度が70~80%飽和程度まで培養した。コルセミド(0.05 μ g/ml、デメコルシン、和光純薬)を含む培養液(20%FBS、DMEM)に交換し、2日間培養しミクロセルを形成させた。培養液を除去し、予め保温(37°C)しておいたサイトカラシンB(10 μ g/ml、シグマ)溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル製遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、34°C、8000rpm、1時間の遠心を行なった。ミクロセルを無血清培地に懸濁し、フィルターで濾過し精製した。マウスA9細胞を80%飽和の状態まで培養した25cm³フラスコに精製した微小核を加えPEG溶液で融合させた。G418を含む選択培地で培養しコロニーを単離した。

上記以外のすべての実験操作及び試薬等は(清水ら、細胞工学ハンドブック、羊土社、p.127-)に従った。

(2) ヒト7番染色体断片を保持するマウスA9細胞クローンの同定

上記のマウスA9細胞ライブラリーから、ヒトCYP3A遺伝子クラスターが存在する

7番染色体断片を保持するクローンを、以下のようにしてヒトCYP3A4遺伝子を特異的に検出できるプライマーを用いてPCRにより同定した。

(CYP3A4検出用プライマー)

センス : 5'-GTCTGTCTGGGTTTGGAAAGG-3' (配列番号1)

アンチセンス : 5'-TCTGTGTTGCTCTTGCTGG-3' (配列番号2)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp 9600を用い、TaqポリメラーゼとしてEx Taq(宝酒造(株))を用い、バッファー及びdNTP(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP)はEx Taq(宝酒造(株))に添付のものを推奨条件に従って用いた。PCRのサイクル条件は、94°C1分の熱変性後、98°C 10秒、65°C30秒、72°C 1分を1サイクルとして35サイクル行った。その結果、陽性クローンが20個得られた。さらに、これらのクローンに対して、ヒト7番染色体多型マーク(D7S664, D7S1496, D7S634, D7S648, D7S505, BIOS社)を用いてPCRを行った。結果を表1に示した。○は陽性、×は陰性であることを示す。

表1において、例えば、クローンH5やZ9は、7番染色体の全長を保持すると考えられた。一方、クローンE22はCYP3A4周辺のみを含んだ断片を保持と考えられた。次に、これらのクローンにおいて、ヒト7番染色体(断片)がどのように存在しているかを調べるために、ヒトCOT-1 DNAをプローブに用いたFISH解析を行った。方法は、W097/07671に記載された方法に従った。PCRの結果から予想されたように、クローンH5においては全長のヒト7番染色体が、クローンE22においては小さなヒト7番染色体断片が独立して存在していることが明らかとなつた。このクローンH5とE22をヒト7番染色体(断片)供与細胞として用いることとした。

1
叢

実施例 2 P450遺伝子の一分子種であるヒトCYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片のES細胞への導入

ヒトCYP3Aファミリー遺伝子をES細胞に導入することを目的とした、ミクロセル融合を試みた。

(1) ミクロセル調製用細胞の培養

ミクロセルを供与するA9細胞は、次に述べる条件で培養した。G418耐性遺伝子でマーキングされたヒト7番染色体を有するマウスA9細胞(E22)を、10%ウシ胎児血清(以下、「FBS」と略記する。シグマ)とG418(800 μ g/ml、ジェネティシン、ギブコ)を添加したダルベッコ改変イーグル倍地(以下、「DMEM」と略記する。ニッスイ)で培養した。

ミクロセル融合に供するES細胞(TT2F、ライフテック・オリエンタル)は、融合を実施する1週間程前から、次に述べる手順で培養を行った。また、その後のミクロセル融合ES細胞(以下、「MH細胞」(Microcell-Hybrid ES)と略記する。)の取り扱いも以下の内容に準じて行った。ES細胞の培養は、20%FBS(ギブコ)、10 μ M非必須アミノ酸(ギブコ)、10⁻⁴M 2-メルカプトエタノール(シグマ)、10³U LIF(白血球増殖抑制因子、ギブコ)を添加したDMEM(以下、「ES用DMEM」と略記する。)を用いて行った。マイトイシンC(シグマ)で処理したフィーダー細胞(Neo耐性初代培養細胞、ライフテック・オリエンタル)をあらかじめ播種した35mmディッシュ(コーニング)にES細胞を播種し、培養した。ES用DMEMを12時間おきに交換した。継代は、2日おきに、目安としてES細胞の細胞密度が80%飽和状態に至った際に行った。ディッシュからES用DMEMを吸引した後にEDTA-PBSでディッシュを3回洗浄し、0.7mlの0.25%トリプシン(ギブコ)で15分間処理した。ディッシュにES用DMEMを添加してトリプシンの反応を止めて、ギルソンピペットマン(P-1000)にてピベッティングにより、細胞懸濁液を15mlチューブ(ファルコン)に回収した後、卓上遠心器で1000rpm、5分間遠心して、細胞のペレットを得た。上清を吸引した後に、細胞を適量のES用DMEMで再懸濁してから、新たなフィーダー細胞播種済みのディッシュに播種した(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995)。

(2) ミクロセル融合

ミクロセルは、以下の手順で得た。E22細胞を24本の25cm²フラスコ（コースター、3025）中で、細胞密度が90%飽和状態になるまで培養した。培養液を、コルセミド（0.06μg/ml、デメコルシン、和光純薬）を含む培養液（20%FBS、DMEM）に交換し、2日間培養してミクロセルを形成させた。前記フラスコから培養液を除去し、あらかじめ37°Cに保温しておいたサイトカラシンB（10μg/ml、シグマ）溶液を含むDMEMで、該フラスコをほぼ一杯になるまで満たした。アクリル製の遠心容器に、フラスコを挿入し温湯（34°C）を注入後、ゴム製のアダプター内にこの容器をセットして34°C、8000rpmで1時間遠心を行った。遠心分離後サイトカラシンBを含むDMEMを除去し、フラスコの底辺部に集積されたミクロセルをDMEMに懸濁して回収した。回収したミクロセル懸濁液をフィルターのメンプラン上の孔径が8μm、5μm、3μmのフィルターの順に濾過しミクロセルを精製した。精製したミクロセルを1500rmp、10分間遠心後5mlのDMEMで再懸濁してから再び1500rpm、5分間遠心、遠心後のチューブは上清を除去せず4°Cで保存しその後のミクロセル融合に供した。

ミクロセル融合は以下の手順で行った。60mmディッシュ（コーニング）2枚分のES細胞をEDTA-PBSで3回洗浄し、トリプシンで処理して細胞をディッシュから剥離し、ES用DMEMで懸濁後、15mlチューブに回収して1500rpm、5分間遠心して細胞を回収した後、上清を吸引した。チューブをタッピングした後、DMEMで細胞を3回洗浄した。洗浄の後、5mlのDMEMで細胞を再懸濁し、これを先に回収しておいたミクロセルの溶液上に静かに重層し、1250rpm、5分間遠心した。遠心後、上清を吸引し、細胞塊をタッピングしてほぐして1分間放置した。PEG1500（ポリエチレングリコール、和光純薬）入りDMEM 0.5mlをチューブの内壁を伝わらせて添加し、1.5分間処理した。PEG1500入りDMEM添加開始から1.5分後に、DMEM9.5mlをチューブに徐々に添加し緩やかに細胞を懸濁した。懸濁後、1250rpm、5分間遠心して上清を除去し、6mlのES用DMEMで細胞を懸濁して、あらかじめ用意しておいた3枚のフィーダー細胞播種済み100mmディッシュ（コーニング）に2mlずつ懸濁液を添加し、100mmディッシュ1枚あたり10mlの培養液で培養を行った。培養は、ES細胞がおよそ50%飽和状態になる48時間後までES用DMEMで培養し、その後G418（ジ

エネティシン、ギブコ）を実効濃度150 μ g/mlとなるよう添加したES用DMEM（以下、「G418添加ES用DMEM」と略記）で培養した。培養開始から8～10日でG418耐性クローニングの出現を確認した。出現したG418耐性クローニングを単離し、フィーダー細胞播種済み24穴プレート（コーニング）に播種、その後フィーダー細胞播種済み12穴プレート（コーニング）、35mmディッシュの順に培養スケールを大きくした。

（3）PCR解析

選択培養の結果、計29個のG418耐性クローニングを得た。これらのクローニングよりPu regene DNA Isolation Kit (Gentra System社) を用いてゲノムDNAを抽出し、PCRによる分析に供した。PCRは、抽出したゲノムDNAを錆型とし、CYP3Aファミリー遺伝子（CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7）を検出する目的のために作製したプライマーを用いて行った。こうして、CYP3Aファミリー遺伝子を含んだヒト7番染色体を有するクローニングを同定した。CYP3A4を検出するためのプライマーは、先述の配列番号1と2のプライマーを用いた。CYP3A5およびCYP3A7を検出するためのプライマー配列は、それぞれ次に示した配列のものを用いた。

（CYP3A5検出用プライマー）

センス : 5'-ATAGAAGGGTCTGTCTGGCTGG-3' (配列番号3)

アンチセンス : 5'-TCAGCTGTGTGCTGTTGTTGC-3' (配列番号4)

（CYP3A7検出用プライマー）

センス : 5'-ACCTGAAATGAAGACGGGC-3' (配列番号5)

アンチセンス : 5'-GAGTTAATGGTGCTAACTGGGG-3' (配列番号6)

PCRの反応液は、10× Ex Taq Buffer (宝酒造) 3 μ l、dNTP (dATP、dGTP、dTTP及びdTTP、各2.5mM) (宝酒造) 4.8 μ l、各プライマー10pmol、ゲノムDNA 100ng、Ex Taq(5U/ml) (宝酒造) 0.5 μ lに滅菌蒸留水を添加して計30 μ lにして、PCR用チューブ（パーキンエルマー）に分注した。PCR反応液の調製の過程の操作は、全て氷上にて行った。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 2400、パーキンエルマー) を85°Cにセットし、85°Cに達したことを確認してからチューブをセ

ットした。85°C 3分、94°C 1分、85°C 1分からなるpre-PCRの後、98°C 10秒、62°C 30秒、72°C 1分を1サイクルとして35サイクル行った。この結果、上記3種類のヒトCYP3Aファミリー遺伝子が検出されたクローンが25個確認された。これらのクローンは、CYP3A遺伝子を含むヒト7番染色体断片を有するESクローンであることが示唆された。

実施例3 CYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片保有ES細胞を用いたキメラマウスの作製

ミクロセル融合により得られたヒト7番染色体保有MH細胞を用いて、CYP3Aファミリー遺伝子含むヒト7番染色体断片を体細胞中に保有するマウスの作製を行った。MH細胞の培養方法は、前述のES細胞の培養方法と同じであるが、MH細胞の維持、増殖には、G418添加ES用DMEMを用いた。

(1) マウス胚の採取と培養

キメラ作製に用いるマウス胚は、MCH系（日本クレア）マウスから採取した。6～8週齢のMCH系メスマウスに妊馬血清性腺刺激ホルモン（セロトロピン、帝国臓器）7.5IUを腹腔内に注射した後48時間で、ヒト総毛性性腺刺激ホルモン（ペローゲン、三共）7.5IUを腹腔内に注射し、同系オスマウスと一緒に同居し交配させた。ヒト総毛性性腺刺激ホルモンを注射してから60～64時間後にメスマウスを屠殺し、卵管から8細胞期胚をM2メディウム（シグマ）を用いて卵管灌流により回収した。60mmディッシュ（コーニング）上に30μl程度のES用DMEMあるいはM16メディウム（シグマ）の液滴を滴下し、さらにその上にバラフィンオイル（ナカラライテスク）を重層した。回収したマウス胚をバストールピペットで少量のM16培養液と共に吸引し、ディッシュ上の液滴内にバストールピペットの先端を入れ吸引していたマウス胚を吐き出した。ディッシュ内のマウス胚は5% CO₂、37°Cの条件下で、必要になるまで培養した。

(2) 細胞注入用ピベットおよび胚保持用ピベットの作製

細胞注入用ピベットは、ガラス管（Microcaps25、ドラモント）を微小電極作製器（PN-3、ナリシゲ）にセットしてガラス管を引き、実体顕微鏡（SMZ、ニコ

ン) 下でガラス管の先端部分を観察しながら先端が鋭利なピンセットで加工することにより、作製した。胚保持用ピベットは、ガラス管 (GDC-1、ナリシゲ) をガスバーナーの小炎で熱して細く引き、アンプルカッターで適度な長さに切断しマイクロフォージ (MF-90、ナリシゲ) に装着し、外径が $150\mu\text{m}$ 程度で切り口が平坦であることを確認して、電熱線により内径を $10\mu\text{m}$ 程度にし、ガスバーナーの小炎で一箇所を曲げることにより作製した。

(3) MH細胞のマウス8細胞期胚への注入

キメラ作製に供するMH細胞は、0.25%トリプシン (ギブコ) で処理し、1000rpm、5分間遠心して回収した後、ES用DMEMで懸濁した。この細胞懸濁液を100mmディッシュ (コーニング) に $30\mu\text{l}$ 程度滴下し、パラフィンオイル (ナカライトスク) を重層し、これをマイクロマニュピュレーター (MMW-202、MMW-204、ナリシゲ) を装着した倒立顕微鏡 (TMD、ニコン) のステージ上に静置した。内部を滅菌蒸留水で満たしたマイクロインジェクター (IM-5、ナリシゲ) にマウス胚保持用のガラス製ピベットを装着し、内部を空気で満たしたマイクロインジェクター (IM-6、ナリシゲ) に細胞注入用ガラス製ピベットを装着した。倒立顕微鏡の視野の中央にMH細胞懸濁液のスポットがくるようにし、細胞注入用ガラス製ピベットをスポット内に入れてMH細胞を吸引した。採卵後、培養していたマウス8細胞期胚20~30個をバストールピベットでスポットに移した。胚保持用ピベットでマウス胚を保定して胚に焦点を合わせ、注入用ピベットを操作して透明体を貫通させ、団卵腔内にMH細胞を10~15個注入した。上記操作を繰り返し行って得えられた操作胚は、先述の60mmディッシュ上に液滴として置きパラフィンオイルを重層したES用DMEMあるいはM16メディウム中に移して、胚盤胞期胚に発生するまで培養し、翌日移植に供した。

(4) 胚の移植

8週齢以上のMCH系メスマウス (日本クレア) を、精管結紮した同系オスマウスと一緒に居、交配させ、翌日膣栓を確認したものを偽妊娠メスマウスとして仮親に用いた。交配させた翌日を妊娠第1日として、妊娠第4日目のマウスを胚移植に供した。麻酔にはトリプロモエタノールアミン (アルドリッヂ) をアミルアルコ

ール（アルドリッヂ）に溶解し、生理食塩水で2.5%濃度になるよう希釈したアバーチンを用いた。アバーチンをマウスの体重に応じて腹腔内に注射して麻酔をかけた。同マウスの背部の毛を刈り、アルコール綿で消毒した後に、外皮を脊椎に沿って切開し、筋層と外皮の間にハサミを入れて両者を剥離した。卵巣を覆う筋層を切開し、脂肪組織をピンセットでつまみ、卵巣、卵管、子宮角の上部を滅菌した濾紙の上に引き出した。移植用ピペットはガスバーナーで熱して一箇所を折り曲げ、内径が胚1個分より若干大きくなるよう加工した。

培養していた胚のうち、形態的に正常な胚盤胞期胚又は桑実期胚をES用DMEM（またはM2メディウム）で洗浄した後、少量のES用DMEMメディウムとともに移植用ピペットに吸入した。吸入は毛細管現象を利用してES用DMEMメディウムを吸入してから空気を入れてピペット内に小さな気泡を1～2個作り、次に10個程度の移植する胚を間隔が空かない様にしてES用DMEMメディウムとともに吸入し、最後に空気の小さな気泡を1個入れて先端部を少量のES用DMEMメディウムで満たした。太い血管を避けて子宮角上部に26G注射針（テルモ）で穴を開けてピペットの先端を子宮内に挿入し、胚を静かに注入した。左右の子宮への移植が終了したら、筋層を縫合し、外皮をオートクリップ（ファルコン）でとめた。

（5）PCR解析

仮親は、胚移植から16～17日で産仔を出産し、生後3週間で離乳するまで哺育させた。妊娠が確認されながらも正常に分娩できない仮親については、出産予定期を過ぎて1日以内に帝王切開して産仔を取り出し、哺育中のメスマウスに里子としてつけて哺育させた。生後3週間で離乳した産仔は性別によってケージを分け、また、個体識別のために耳にパンチングして穴を開けた。個体識別後のマウスは尾部を1～1.5cm程度切断し、さらに手術用鋏で細切した。サンプルを15mlチューブに移し、Puregene DNA Isolation Kit (Gentra System 社) を用いてゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行った。

CYP3Aファミリー遺伝子（CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7）を検出する目的のために作製したプライマーを用いてPCRを行うことで、これらCYP3Aファミリー遺伝子を含んだヒト7番染色体を有するマウス個体を同定した。CYP3A4を検出するための

プライマー配列は配列番号1および2、CYP3A5を検出するためのプライマー配列は配列番号3および4、CYP3A7を検出するためのプライマー配列は配列番号5および6のものをそれぞれ用いた。

PCRの反応液は、10×Ex Taq Buffer（宝酒造）3μl、dNTP(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP、各2.5mM)（宝酒造）4.8μl、各プライマー10pmol、ゲノムDNA100ng、Ex Taq(5U/ml)（宝酒造）0.5μlに滅菌蒸留水を添加して計30μlにして、PCR用チューブ（パーキンエルマー）に分注した。PCR反応液の調製の過程の操作は全て氷上にて行った。サーマルサイクラー（GeneAmp PCR system 2400、パーキンエルマー）を85°Cにセットし、85°Cに達したことを確認してからチューブをセッタした。85°C 3分、94°C 1分、85°C 1分のpre-PCRの後、98°C 10秒、62°C 30秒、72°C 1分を1サイクルとして35サイクルの反応を行った。この結果、上記3種類のヒトCYP3Aファミリー遺伝子の何れかが検出されたマウス個体が確認された。これらのマウスはCYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片を保有するキメラマウスであると考えられた。

実施例4 CYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片を保有するキメラマウスにおけるCYP3A4遺伝子の発現の検定

作製されたマウスのうち、PCR解析によってCYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片を保有するキメラマウス（以下、「キメラマウス」と略記する）と考えられた個体に関して、導入されたCYP3A4遺伝子が個体レベルで発現しているのかを確認するため、RT-PCRによる解析を行った。

CYP3A4の発現を誘導する物質として知られるリファンピシン（rifampicin）（シグマ）がキメラマウスにおけるCYP3A4遺伝子の発現に及ぼす影響についても同時に検討するため、RNAを抽出するマウスを表2に示すように設定した。なお、投与液はリファンピシンをコーンオイル（シグマ）に懸濁して調製した。また、一回の投与量は100mg/kgとした。

表 2

検体	処理方法
キメラマウス	リファンビシン 100mg/kg を4日間腹腔内投与
キメラマウス	媒体（コーンオイル）を4日間腹腔内投与
MCH系マウス	リファンビシン 100mg/kg を4日間腹腔内投与
MCH系マウス	媒体（コーンオイル）を4日間腹腔内投与

これらのマウスから、肝臓、小腸、腎臓、脾臓、肺、心臓の各種臓器を摘出し、液体窒素により急速凍結後破碎して ISOGEN (ニッポンジーン) により全RNAを抽出した。抽出したRNAはRNaseを含まない滅菌水 (RNase free water) に溶解してから-80°Cで保存し、必要に応じてその一部をcDNA合成に用いた。

次に、各種臓器のRNA溶液の一部からcDNAを合成した。まず、RNA溶液に混入しているゲノムDNAの除去のため、1.5mlチューブにRNA 1~5μg、DNaseI (ギブコ) 1μl、10× DNaseI reaction buffer (ギブコ) 1μl、RNase free waterで全量10μlとし、室温で15分間インキュベートしてDNaseによる処理を行った。この反応液に25mM EDTA 1μlを添加してDNaseの反応を止め、さらに65°Cで10分間インキュベートした。

次に、Super Script™ Preamplification System (ギブコ) を用いてcDNA合成を行った。上記のDNase処理済のRNA溶液にRandam hexamers (ギブコ) 1μlを添加し、70°Cで10分間インキュベートしてからチューブを氷上に移した。このチューブに10×PCR buffer (ギブコ) 2μl、25mM MgCl₂ 2μl、dNTP(dATP、dGTP、dTTP及びdTTP、各10mM)1μl、0.1M DTT 2μlをそれぞれ添加し、緩やかに混和後、25°Cで5分間インキュベートした。これに逆転写酵素 (Super ScriptII RT、ギブコ) 1μlを添加し、25°C 10分間、42°C 50分間、70°C 15分間の順にインキュベートしてから、チューブを氷上に移した。さらに、E. coli RNaseH (ギブコ) を1μl添加し、37°Cで20分間インキュベートして溶液内に残留しているRNAを除去した。

次に、合成されたcDNAを鋳型としてPCRを行った。CYP3A4のcDNAを検出する目的のために作製したプライマーを用いて、各臓器における遺伝子発現の検討を行った。プライマー配列は、以下に示す配列のものを使用した。

(CYP3A cDNA検出用プライマー配列)

センス : 5'-CAAGACCCCTTGTGGAAAA-3' (配列番号7)

アンチセンス : 5'-TCTGAGCGTTCATTCACCA-3' (配列番号8)

PCRの反応液は、10×Ex Taq Buffer (宝酒造) 3μl、dNTP(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP、各2.5mM) (宝酒造) 4.8μl、各プライマー10pmol、ゲノムDNA 100ng、Ex Taq(5U/ml) (宝酒造) 0.5μlに滅菌蒸留水を添加して計30μlにして、PCR用チューブ (パーキンエルマー) に分注した。PCR反応液の調製の過程の操作は全て氷上にて行った。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 2400、パーキンエルマー) を94°Cにセットし、94°Cに達したことを確認してからチューブをセットした。94°C 5分のpre-PCRの後、94°C 30秒、60°C 1分、72°C 1分を1サイクルとして35サイクルの反応を行い、さらに、72°Cで15分処理した。各マウスの肝臓のサンプルについて電気泳動を行い、CYP3A4の発現の有無を調べたところ、リファンピシンを投与したキメラマウスの肝臓においてCYP3A4の発現を認めた。

上記の結果が、マウス内因性Cyp遺伝子など他の遺伝子のmRNA由来のcDNAを誤って増幅した結果によることも懸念されたため、リファンピシン投与したキメラマウスのサンプルを制限酵素EcoRIで処理した。ヒトのCYP3A4の産物が増幅された場合はEcoRI処理によって一箇所切断されるはずであったが、予想通り250bp付近に2本のバンドが得られた (図1)。図中の②はリファンピシン投与マウス肝由来のPCR産物をEcoRI処理した結果、③はヒト肝由来RNAのPCR産物をEcoRI処理した結果、④はリファンピシン投与マウス肝由来のPCR産物、⑤はヒト肝由来RNAのPCR産物である。さらに、このPCR産物の遺伝子配列を解析した結果、ヒトCYP3A4遺伝子の配列の一部と一致することが確認された。その他の臓器についてもCYP3A4の発現について調べたところ (図2)、リファンピシンを投与したキメラマウスの肝臓 (図中①) と小腸 (図中②) にヒトCYP3A4遺伝子の発現が認められた。

実施例5 CYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片保有TC (Trans - Chromosomal) マウスの作製

作製されたキメラマウスをファウンダーとして、ヒト7番染色体断片を持つ子

孫マウス（TCマウス）の作製を試みた。

ファウンダーとするキメラマウスは、ヒトCYP3A4、3A5、3A7が確認された100%キメラ（体表の100%の部分でアグーチの色を示す個体）を用いた。使用しているMH細胞はTT2F由来であるため、100%キメラマウスは全てメスの表現型を示し、これをMCH系のオスマウスと同居させ、交配して産仔を得た。得られた同腹の11匹のF1世代の産仔について、尾部を1~1.5cm程度切断し、さらに手術用鉄で細切した。サンプルを15mlチューブに移しPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System 社) を用いてゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行った。CYP3Aファミリー遺伝子（CYP3A4、CYP3A5）を検出する目的のために作製したプライマーを用いてヒト7番染色体を有するTCマウス個体を同定した。

(CYP3A4検出用プライマー)

センス : 5'-GCCATAGAGACAAGGGCAAG-3' (配列番号9)

アンチセンス : 5'-TCAGTGAGGCTGTTGGATTG-3' (配列番号10)

(CYP3A5検出用プライマー)

センス : 5'-CTGGTCACCCACCATGTGTA-3' (配列番号11)

アンチセンス : 5'-TATCCTCTCACCTGCCCTTG-3' (配列番号12)

PCRの反応液は、10×Ex Taq Buffer (宝酒造) 3μl、dNTP(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP、各2.5mM) (宝酒造) 4.8μl、各プライマー10pmol、ゲノムDNA 100ng、Ex Taq(5U/ml) (宝酒造) 0.5μlに滅菌蒸留水を添加して計30μlにして、PCR用チューブ（パーキンエルマー）に分注した。PCR反応液の調製の過程の操作は全て氷上にて行った。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 2400、パーキンエルマー) を85°Cにセットし、85°Cに達したことを確認してからチューブをセットした。85°C 3分、94°C 1分、85°C 1分のpre-PCRの後、94°C - 30秒、62°C - 45秒、72°C - 1分のサイクルを40回行った後、72°Cで20分間処理した。この結果、CYP3A4に関しては5個体で検出され、CYP3A5については1個体で検出された。以上の結果から、CYP3A4と3A5の両方が検出された1個体について、CYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片を保有するTCマウスであると判断した。

実施例 6 マウス内在性Cyp3a遺伝子クラスターの物理地図作製

(1) Cyp3a11、13、16、25を含むBACクローンの単離

マウス (C57BL/6、129/Sv) 由来のBACライブラリー（クラボウ）から、PCR及びハイブリダイゼーションによって、Cyp3a11、13、16又は25を含むBACクローンの単離を行った。

Cyp3a11、13、16、25の各々の遺伝子を検出するためのPCRプライマーには以下の配列を用いた。

(Cyp3a11検出用プライマー)

センス : 5'-GACACAATTGTCAAGGGATGG-3' (配列番号13)

アンチセンス : 5'-GCTGACAAACAAGCAGGGAT-3' (配列番号14)

(Cyp3a13検出用プライマー)

センス : 5'-ATGTACCTGCCCTTGGGAG-3' (配列番号15)

アンチセンス : 5'-GGAGTGCGTTCTGGTTGA-3' (配列番号16)

(Cyp3a16検出用プライマー)

センス : 5'-TGGTCTCCCATATCTCAGGC-3' (配列番号17)

アンチセンス : 5'-CAATGTACCAAGTGAGAGCGC-3' (配列番号18)

(Cyp3a25検出用プライマー1)

センス : 5'-AGAAGAAGAGAAAGGGAGCC-3' (配列番号19)

アンチセンス : 5'-CATTCAACCACCATGTCCAGG-3' (配列番号20)

(Cyp3a25検出用プライマー2)

センス : 5'-AAACCAGAAGAACCGAGTGG-3' (配列番号21)

アンチセンス : 5'-GTGACAGGTGCCTTATTGGG-3' (配列番号22)

さらに、Cyp3a11、13、16においては、C57BL/6マウス由来のゲノムDNAをテンプレートとしてPCRを行い、その産物をハイブリダイゼーション用のプローブに用いた。Cyp3a25については、Mouse liver QUICK-Clone cDNA (クローンテック) をテンプレートとしてPCRを行い、その産物をハイブリダイゼーション用のプロ

ープに用いた。PCRは、サーマルサイクラーとして、Perkin-Elmer社製のGeneAmp 9600を用い、TaqポリメラーゼはEx Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP)はEx Taq（宝酒造）に添付のものを推奨条件に従つて用いた。サイクル条件は、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、65°C 30秒、72°C 1分を1サイクルとして35サイクル行った（以下に述べるPCRも、断りのない限り、全てこの条件で行った）。

実際のマウスBACライブラリー（クラボウ）のスクリーニングは、クラボウの受託スクリーニングによって行い、以下の結果を得た。

表 3

遺伝子	スクリーニング方法	BACの由来	陽性クローン数
Cyp3a11	PCR	129/Sv	1クローン
	ハイブリダイゼーション	C57BL/6	3クローン
Cyp3a13	PCR	129/Sv	1クローン
	ハイブリダイゼーション	C57BL/6	2クローン
Cyp3a16	PCR	129/Sv	3クローン
	ハイブリダイゼーション	C57BL/6	8クローン
Cyp3a25	ハイブリダイゼーション	C57BL/6	2クローン

(2) Cyp3a11、13、16、25を含むBACクローンのコンティグ作製

上記の陽性BACクローン（Cyp3a11、13、16、25のいずれかを含むクローン）から、プラスミド自動抽出装置（クラボウ）を用いてBAC DNAを抽出し、Hybond-N+メンブレン（アマシャム）にスポットし、Cyp3a11、13、16、25を特異的に検出できるプローブ（BACライブラリーのスクリーニングに用いたもの）を用いてドットハイブリダイゼーションを行った（プローブの作製、条件などは、Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994に従つた）。その結果を図3に示した（全てのBACクローンではなく、代表的なクローンのみを表示した）。

Cyp3a11と16の両プローブで陽性となるBACクローンが数クローン存在した（例えば、クローン680）。これらのクローンに対して、配列番号13と17のプライマーでシークエンス解析を行った結果（東レリサーチセンターへ委託）、確かに同一のBACクローン中にCyp3a11と16のシークエンスが存在することが明らかとなつた。このことは、Cyp3a11と16とがおよそ100 kb以内の距離で隣接して存在していることを示している。次に、この3a11-3a16を含むBACクローンが3a13、3a25を含むBACクローンとどのような位置関係にあるかを調べるために、3a11、16のみを含むBACクローン（例えば、それぞれクローン679、740）の末端シークエンシングを行つた（東レリサーチセンターへ委託）。BACベクター中にはインサートDNAのクローニング部位の両端にT7プロモーターとSP6プロモーターのシークエンスが存在し、これらをプライマーに用いることで両末端のシークエンスが可能になる。クローン679のSP6側のシークエンスから以下のプライマーを設計し、残りのBACクローンに対してPCRを行つた。

（クローン679のSP6側プライマー）

センス : 5'-TAGGGTGAAGACATGGTGGC-3' (配列番号23)

アンチセンス : 5'-GGAGGAGAGGGAGATGTTGAT-3' (配列番号24)

その結果、3a25を含むクローン9736と273P5とが陽性にあつた。前述したように、配列番号23のプライマーでクローン9736と273P5をシークエンス（東レリサーチセンターへ委託）した結果、確かにクローン679とクローン9736、273P5とがリンクしていることが明らかとなつた。このことから、3a16-3a11-3a25の順序で染色体上に存在していると考えられた。一方、3a16のみを含むBACクローン740をSP6プライマーでシークエンス（東レリサーチセンターへ委託）し、ホモロジー検索を行つた結果、いくつかのジンクフィンガー遺伝子とヒットした。実際にこのDNAシークエンスをコンピューター上でアミノ酸配列に翻訳すると、C2H2タイプのジンクフィンガーモチーフ（例えば、Kuroiwaら, Nature Genet., 12:186-190, 1996）と思われるアミノ酸配列が存在した。このことから、3a16-3a11-3a25クラスターの外側にはジンクフィンガー遺伝子（Zfpと呼ぶ）が存在している可能性が考えられる（Zfp-3a16-3a11-3a25）。

また、3a16のみを含むBACクローン741をT7プライマーでシークエンス（東レリサーチセンターへ委託）し、ホモロジー検索を行った結果、3a11, 13, 16, 25と相同性を示すが、いずれの4遺伝子とも一致はしない配列が存在することが分かった。このことは、新規のCyp3a遺伝子の存在を示唆し、仮にCyp3aYと呼ぶこととする。BACクローン741は3a16のみを含み、かつその末端に3aYが存在することから、Zfp-3aY-3a16-3a11-3a25の順番で染色体上に存在していることが示唆され、3aYがクラスターの一端であると考えられた。さらに、BACクローン740をT7プライマーでシークエンス（東レリサーチセンターへ委託）し、ホモロジー検索を行った結果、ラットのCyp3A遺伝子と高い相同性を示し、マウスでは3a13とのみ弱い相同性を示す配列が存在することが分かった。このことも、さらなる新規のCyp3a遺伝子の存在を示唆し、仮にCyp3aXと呼ぶこととする。BACクローン740は3a16のみを含み、かつその末端に3aXが存在することから、Zfp-3aY-3a16-3aX-3a11-3a25の順番で染色体上に存在していることが示唆された。

次に、3a25がこのクラスターの残りの一端である可能性を検討するために、3a25を含むBACクローン9736に対してT7プライマー及びSP6プライマーを用いて末端シークエンシングを行った（東レリサーチセンターへ委託）。このシークエンスを基に以下のSTSプライマーを設計した。

（クローン9736のT7側プライマー）

センス : 5'-AGATGTGTGGCCTTGTAAAGG-3' (配列番号25)

アンチセンス : 5'-TTTCTGGATGTCACTGGTCC-3' (配列番号26)

このプライマーを用いて手元のBACクローン（Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローン）に対してPCRを行った結果、T7側がクラスターの外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるマウスBACライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、クローン29H12が得られ、同様に末端シークエンシングを行い、以下のSTSプライマーを設計した。

（クローン29H12のSP6側プライマー）

センス : 5'-TAGAAGCCCCAACTTTGGGAC-3' (配列番号27)

アンチセンス : 5'-AGCCAACAAAGAGGGTGTACG-3' (配列番号28)

このプライマーを用いて手元のBACクローンに対してPCRを行った結果、SP6側がクラスターの外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるマウスBACライブラリーのスクリーニングを行い、クローン41012を得た。ここで、「発明の実施の形態」の項に述べたように、クラスターの末端を決めるために、3a25の全長に近いcDNAプローブを用いて、得られた全てのBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン) に対して、緩い条件でのハイブリダイゼーションを行った。cDNAプローブは以下のプライマーを用いてMouse liver QUICK-Clone cDNA (クローンテック) をテンプレートとしてPCRを行うことによって作製した。

(Cyp3a25用プライマー3)

センス : 5'-GGCCTGAAC TGCTAAAGGAAAGCTA-3' (配列番号29)

アンチセンス : 5'-GGTGAACATCCACAACTACCATTGAG-3' (配列番号30)

ハイブリダイゼーションの条件は60°Cで行い、洗浄は2×SSC, 0.1% SDS存在下、60°Cで行った以外は、上記と同様である。その結果、クローン41012のみが陰性であったため、クラスターはクローン29H12までで、従って3aY-3a16-3aX-3a11-3a25で完結していると考えられた。

(3) Cyp3a13近傍のBACコンティグの作製

Cyp3a13を含むBACクローン (クローン703, 503, 705) は、上記のスクリーニングの範囲では、Cyp3a11、16、25を含むいずれのBACクローンともつながらなかった。そこで、クローン703を出発材料として、上記のように染色体ウォーキングを行うこととした。まず、クローン703の末端シークエンス (東レリサーチセンターへ委託) を行い、以下のプライマーを設計した。

(クローン703用SP6側プライマー)

センス : 5'-ACAGGGAGTAGGTGACACTGTTG-3' (配列番号31)

アンチセンス : 5'-GGGTTGTTGGACTCACAGAGAG-3' (配列番号32)

(クローン703用T7プライマー)

センス : 5'-GACCTCACACTGGCAAGAAGTC-3' (配列番号33)

アンチセンス : 5'-ATGGTGCTCAGCAATAGTAGGG-3' (配列番号34)

これらのプライマーを用いてBACライブラリーをスクリーニングすることによって、クローン703のSP6側とT7側の両方向に対して染色体ウォーキングを行うことができる。まず、703/T7プライマーを用いてスクリーニングした結果、クローン220H2と234H9が得られた。これらのクローンの末端シークエンス（東レリサーチセンターへ委託）を行い、以下のプライマーを設計した。

(クローン220H2用T7側プライマー)

センス : 5'-GCAGGATACCAAGATATGTGGC-3' (配列番号35)

アンチセンス : 5'-AAACCCCTTAAACCCACAGC-3' (配列番号36)

(クローン220H2用SP6側プライマー)

センス : 5'-GGTGTACACCGCCTTCATC-3' (配列番号37)

アンチセンス : 5'-CTGCTCAAAGGAGAACAGGG-3' (配列番号38)

これらのプライマーを用いて手元のBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン) に対してPCRを行った結果、SP6側が外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるBACライブラリーのスクリーニングを行い、クローン130A11と29B19を得た。これらのクローンの末端シークエンシングを行い、以下のプライマーを設計した。

(クローン130A11用T7側プライマー)

センス : 5'-CCACACATTCTGCCAATCAG-3' (配列番号39)

アンチセンス : 5'-AGTACAGCACCGGGCTAAAG-3' (配列番号40)

(クローン130A11用SP6側プライマー)

センス : 5'-GCAACAATAACCCAAC TGCC-3' (配列番号41)

アンチセンス : 5'-CAGGTGGTAATAAGCTGCC-3' (配列番号42)

(クローン29B19用T7側プライマー)

センス : 5'-GCATGAAGCACTGTCTCGTC-3' (配列番号43)

アンチセンス : 5'-GGGGTCCTCCTTCAATATCC-3' (配列番号44)

(クローン29B19用SP6側プライマー)

センス : 5'-TCTCTGCCTCTCATCTTAGCC-3' (配列番号45)

アンチセンス : 5'-TGTGTGTGGGTTGGTGTCTC-3' (配列番号46)

これらのプライマーを用いて手元のBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン) に対してPCRを行った結果、クローン29B19のT7側が外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるBACライブラリーのスクリーニングを行い、クローン204B19と173D23を得た。これらのクローンの末端シークエンス（東レリサーチセンターへ委託）を行い、以下のプライマーを設計した。

(クローン173D23用SP6側プライマー)

センス : 5'-CGGCTCTCACAAATAGACCC-3' (配列番号47)

アンチセンス : 5'-CCAGGTTATCGCTGGTCTTC-3' (配列番号48)

このプライマーを用いて手元のBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン) に対してPCRを行った結果、クローン173D23のSP6側が外側に位置することが分かった。

一方、703/SP6プライマーを用いてスクリーニングした結果、クローン86H16が得られた。このクローンの末端シークエンシングを行い、以下のプライマーを設計した。

(クローン86H16用SP6側プライマー)

センス : 5'-TCACGACCTTATGCAAAGACC-3' (配列番号49)

アンチセンス : 5'-CGGGAAGTATTGCTTCAGC-3' (配列番号50)

(クローン86H16用T7側プライマー)

センス : 5'-TCAGTCGTTACCAGCCTTTG-3' (配列番号51)

アンチセンス : 5'-GAGTGGGCTCTGGTCATTTC-3' (配列番号52)

これらのプライマーを用いて手元のBACクローン（Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン）に対してPCRを行った結果、クローン86H16のSP6側が外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるBACライブラリーのスクリーニングを行い、クローン204L9を得た。このクローンの末端シークエンス（東レリサーチセンターへ委託）を行い、以下のプライマーを設計した。

（クローン204L9用SP6側プライマー）

センス : 5'-TCTCAGCATAGTTCAGGGGC-3' (配列番号53)

アンチセンス : 5'-TTTCTTCAGCTCTGGGTGG-3' (配列番号54)

このプライマーを用いて手元のBACクローン（Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン）に対してPCRを行った結果、クローン204L9のSP6側が外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるBACライブラリーのスクリーニングを行ったが、204L9自身以外の陽性クローンはこのライブラリーには存在しなかった。この段階で、スクリーニングを一時中断し、上記のように3a25の全長に近いcDNAプローブを用いて、得られた全てのBACクローン（3a13を含むBACクローンのコンティグ）に対して、緩い条件でのハイブリダイゼーションを行った。その結果、陽性になったクローンは703, 503, 705, 9743, 220H2, 234H9, 130A11で、それよりもさらに外側に位置するBACクローン29B19, 204B19, 173D23, 9667, 86H16, 204L9は陰性だった。このことは、3a13の近傍には他に新規Cyp3a遺伝子は存在せず、3a13は上記のクラスター3aY-3a16-3aX-3a11-3a25とは離れて、孤立して染色体上に存在していることを示唆している。

以上の実験結果を図3にまとめた。赤いBACクローンは3a25の全長に近いcDNAプローブで陽性だったクローンで、黒いBACクローンは陰性だったクローンを示す。

実施例7 マウスCyp3a遺伝子クラスター3aY-3a16-3aX-3a11-3a25を欠失させるた

めのターゲティングベクターの作製

(1) カセットベクターploxPUP, ploxPDOWNの作製

Cyp3a遺伝子クラスターの両端のそれぞれにloxPを挿入するためのカセットベクターploxPUP及びploxPDOWNを、以下のように作製した。まず、ploxPUPの作製について述べる。プラスミドpBluescript II SK(-)（東洋紡）を制限酵素EcoRV（ベーリンガー）で切斷し、脱リン酸化酵素CIAP（仔牛小腸由来アルカリ脱リン酸化酵素、宝酒造）を用いて、50°Cで30分間反応し、切斷末端を脱リン酸化した。これに、プラスミドpBS302（ギブコ）から制限酵素SpeIとHindIII（ベーリンガー）で切り出してDNA Blunting kit（宝酒造）で平滑末端化したDNA断片を、DNA Ligation kit（宝酒造）を用いてライゲーションし、エシェリヒア・コリのコンピテントセルDH5（東洋紡）を形質転換した（プラスミドpBS302HS）。平滑末端化、ライゲーション及び形質転換は、各キットに添付のプロトコールに従って行った。

次にプラスミドpSTneo（Katohら, Cell Struct. Funct., 12:575, 1987）から制限酵素XhoI（ベーリンガー）で切り出し、DNA Blunting kit（宝酒造）で平滑末端化したDNA断片を、プラスミドpBS302HSのSmaI部位（上記と同様に、脱リン酸化処理した）にDNA Ligation kit（宝酒造）を用いてクローニングし、プラスミドploxPneoを得た。プラスミドpMC1DT-A（ギブコ）を制限酵素ApaI（ベーリンガー）で切斷、平滑化、及び脱リン酸化し、リン酸化NotIリンカー（宝酒造）を挿入し、プラスミドpMC1DT-ANを得た。

同様にして、プラスミドpMC1DT-ANのSalI部位にSpeIリンカー（宝酒造）を挿入し、このプラスミドから制限酵素SpeIとNotI（ベーリンガー）で切り出したDNA断片を、SpeIとNotIで切斷したプラスミドploxPneoにクローニングした。最後に、このプラスミドを制限酵素SalI（ベーリンガー）で切斷、脱リン酸化し、プラスミドpGKPuro（WHITEHEAD INSTITUTE, Dr. Peter W. Lairdから分与）から制限酵素SalIとXhoI（ベーリンガー）で切り出したDNA断片をクローニングし、プラスミドploxPUPを得た。

次に、プラスミドploxPDOWNの作製について述べる。まず最初に、プラスミドpBluescript II SK(-)（東洋紡）のSacI部位に上記のようにしてFseIリンカーを

挿入した。FseI リンカーは、以下の配列のオリゴDNAを合成し、5'末端をリン酸化した（合成はグライナーに委託）。

(FseI リンカー)

5' -pGCCGGCC-3'

このプラスミドを制限酵素BamHI（ベーリンガー）で切断、脱リン酸化し、プラスミドpBS302（ギブコ）から制限酵素BamHI（ベーリンガー）で切り出したDNA断片をクローニングした。このプラスミドを制限酵素SalIとKpnI（ベーリンガー）で切断し、プラスミドpMC1DT-A（ギブコ）から制限酵素SalIとKpnI（ベーリンガー）で切り出したDNA断片をクローニングした（プラスミドploxPDT-A）。次に、プラスミドpGREEN LANTERN-1（ギブコ）のClaI部位に上記のようにSpeI リンカー（宝酒造）を挿入し、このプラスミドから制限酵素SpeI（ベーリンガー）で切り出したDNA断片を、SpeIで切断後、脱リン酸化したプラスミドploxPDT-Aにクローニングした。最後に、このプラスミドを制限酵素SmaI（ベーリンガー）で切断、脱リン酸化し、プラスミドpGKPuroから制限酵素SalI（ベーリンガー）で切り出し、平滑化したDNA断片をクローニングした（プラスミドploxPDOWN）。

上記のようにして構築したカセットベクターploxPUP及びploxPDOWNの構造を図4に示した。

(2) マウスCyp3a遺伝子クラスター両末端のゲノムDNAのクローニング

Cyp3a遺伝子クラスターの一端に相当するCyp3aY遺伝子領域のクローニングについて以下に述べる。図4に示したように、このクラスターのCyp3aY側で最も外側に相当するゲノム領域は、BACクローン741のT7末端領域であるので、この部分のクローニングを行った。BACクローン741を制限酵素XbaI（ベーリンガー）で切断すると、T7末端領域を含んだおよそ13 kbのDNA断片が得られ、これを制限酵素XbaIで切断したλDASH IIベクター（ストラタジーン）にDNA Ligation kit（ストラタジーン）を用いてライゲーションし、Gigapack III Gold packaging extract（ストラタジーン）を用いてパッケージングした。バーケッジングはキットに添付のプロトコールに従った。この組換えファージに対して、BACクローン741

のT7末端プローブを用いてブラークハイブリダイゼーションを行い、BACクローン741のT7末端領域13 kbのDNA断片を含んだ組換えファージを得た。得られたファージをクローン入UPと呼ぶ。BACクローン741のT7末端プローブは、以下のオリゴDNA（合成はグライナーに委託）を用いて行った。

（クローン741用T7側プライマー）

センス： 5'-GTTCCCTCTGTAATTCTAATGTACATCCACTGGTTGAAAGGTCTATGATAA3'（配列番号55）

ハイブリダイゼーションは、6×SSC, 0.5% SDS, 5×Denhardt中で57°C、オーバーナイトで行い、洗浄は2×SSC, 0.5% SDS中、65°Cで行った。

次に、Cyp3a遺伝子クラスターの残りの一端に相当するCyp3a25遺伝子領域のクローニングについて以下に述べる。図5に示したように、このクラスターのCyp3a25側で最も外側に相当するゲノム領域は、BACクローン29H12のSP6末端領域であるので、この部分のクローニングを行った。このBACクローンは129/Svマウス由来であるので、29H12のSP6末端プローブを用いたC57BL/6マウス由来のゲノミックライブラリー（クローンテック）のスクリーニングから行った。29H12のSP6末端プローブは、配列番号27と28のプライマーで増幅したPCR産物を用い、ブラークハイブリダイゼーションを行った。

約200万ブラークをスクリーニングした結果、30個の陽性クローンが得られ、この内の6クローンを任意に選んで制限酵素地図の作製を行った。制限酵素SalIとEcoRI（ベーリンガー）で切断したところ、1つのクローン（λDOWN12）で約8 kbのDNA断片が生じた。この断片はEcoRIのみで切断した際には生じなかったことから、その末端構造はSalI切断部位とEcoRI切断部位になっていると考えられる。この断片を、制限酵素SalIとEcoRI（ベーリンガー）で切断したプラスミドpBluescript II SK(-)（東洋紡）にクローニングし、プラスミドpDOWNを得た。挿入DNA断片についてプライマーM13-20でシークエンス（東レリサーチセンター）した結果、入ファージベクターのSP6末端側であることが分かった。このシークエンスから以下のプライマーを設計した。

(クローン入DOWN12用SP6側プライマー)

センス : 5'-TTCGGGAGGCCAGTACTATTC-3' (配列番号56)

アンチセンス : 5'-CACACACGTCTTTGGCAG-3' (配列番号57)

このプライマーを用いて、BACクローン29H12と41012に対してPCRを行ったところ、29H12のみが陽性となったので、図5に示した位置関係にあることが分かった。

以上の結果から、Cyp3a遺伝子クラスターの両末端ゲノム領域に相当するクローンとして、入ファージ入UPとプラスミドpDOWNを以下に述べるターゲティングベクター作製に用いることとした。

(3) ターゲティングベクターploxP3aUP, ploxP3aDOWNの作製

まず、ターゲティングベクターploxP3aUPの作製について述べる。入ファージクローン入UPを制限酵素BamHIとHindIII (ベーリンガー)で切断すると約7.5 kbのDNA断片が生じ、これを制限酵素BamHIとHindIIIで切断したプラスミドpBluescript II SK(-) (東洋紡)にクローニングし、プラスミドpUPを得た。ただし、予めプラスミドpBluescript II SK(-)のXhoI部位を以下のようにして欠失させておいた。プラスミドpBluescript II SK(-)を制限酵素XhoI (ベーリンガー)で切断し、平滑末端化後、セルフライゲーションした。同様にして、プラスミドpUPのKpnI部位を欠失させた後、制限酵素XhoI (ベーリンガー)で切断し、平滑末端化後、KpnIリンカー (宝酒造)を挿入した。このプラスミドを制限酵素Not IとXbaI (ベーリンガー)で切断し、プラスミドpMC1DT-ANから制限酵素Not IとSpeI (ベーリンガー)で切り出したDNA断片をクローニングした。最後に、このプラスミドを制限酵素KpnI (ベーリンガー)で切断、脱リン酸化し、プラスミドploxPUPを制限酵素FseI (宝酒造)で切断し、平滑末端化後、KpnIリンカー (宝酒造)を挿入し、制限酵素KpnI (ベーリンガー)で切り出したDNA断片をクローニングした (ターゲティングベクターploxP3aUP、図6)。

次に、ターゲティングベクターploxP3aDOWNの作製について述べる。まず、プラスミドpDOWNを制限酵素EcoRI (ベーリンガー)で切断し、平滑末端化後、SalIリンカー (宝酒造)を挿入した。このプラスミドを制限酵素NotIとSpeI (ベーリ

ンガー)で切断したのに、プラスミドpMC1DT-ANから制限酵素Not IとSpeI(ベーリンガー)で切り出したDNA断片をクローニングした。次に、このプラスミドを制限酵素Not I(ベーリンガー)で切断し、平滑末端化後、SrfIリンカーを挿入した。SrfIリンカーは以下の合成オリゴDNA(グライナー)を用いた。

(SrfIリンカー)

5' -pGCCCGGGC-3'

このプラスミドを制限酵素XbaI(ベーリンガー)で切断し、平滑末端化後、前記のFseIリンカーを挿入した。このプラスミドを制限酵素FseI(宝酒造)で切断し、脱リン酸化した。このプラスミドに、プラスミドploxPDOWNを制限酵素KpnI(宝酒造)で切断し、平滑末端化後、前記のFseIリンカーを挿入し、制限酵素FseI(宝酒造)で切り出したDNA断片をクローニングした(ターゲティングベクター-ploxP3aDOWN、図7)。

実施例8 マウスES細胞Cyp3a遺伝子クラスターの一端にloxP配列を挿入した細胞株の取得

(1) loxP配列挿入細胞株の取得(その1)

マウス内在性Cyp3a遺伝子クラスターを破壊するため、上記の実施例で示した2つのターゲティングベクターploxP3aUPとploxP3aDOWNを用いてCyp3a遺伝子クラスターの両末端にloxP配列を挿入した。まず、ターゲティングベクター-ploxP3aUPを制限酵素NotI(宝酒造)で線状化し、従来の方法(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995)に従い、マウスES細胞TT2Fへ導入した。具体的には、TT2F細胞をトリプシン処理し、 2.5×10^7 個/mlとなるように冷HBS(HEPES-buffered saline)に懸濁してから、ベクター45μgを加え、ジーンバルサー(バイオラッド)を用いて、250V, 960μFの条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションした細胞を8mlのES培地(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995)に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞をまいた60mmディッシュ8枚に播種した。48時間培養し、その後G418(GIBCO) 300μg/ml(見かけ濃度)を含む培

地中で約10日間選択培養した。生じたG418耐性コロニー144個をピックアップし、48穴プレートでコンフルエントになるまで培養した後、48穴プレート1穴分の細胞を4穴プレート2穴に播種した。4穴プレート1穴分を-80°Cにて凍結保存した。残りの1穴分はゲノムDNA取得用として3.5cmゼラチンコートしたディッシュに播種し培養した。その他のマウスES細胞の取り扱いの具体的な手順はW097/07671、W098/37757に記載の方法に従った。

ゲノムDNAの抽出は、フェノール法により行った。抽出したゲノムDNAを制限酵素HindIII (NEB) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、サザンハイブリダイゼーションにより、相同組換え体 (ES/loxP3aUPと呼ぶ) の同定を行った。ターゲッティングベクターploxP3aUPと相同組換えが起こったクローンを検出するためのサザンプロット用プローブとして、マウスCyp3aY領域のDNA断片（約400塩基対）を用いた。このDNA断片は以下の条件でC57BL/6マウスDNAを鋳型としてPCR増幅して得た。

(マウスCyp3aYプローブ用プライマー)

センス : 5'-ACGGTTTATGCATGCTAGGTG-3' (配列番号58)

アンチセンス : 5'-TCCATGACAATAAGGCTGCC-3' (配列番号59)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqボリメラーゼはLA Taq (宝酒造) を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は、85°C 3分、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、65°C 30秒、72°C 1分を1サイクルとして35回サイクル行った。

上記プローブ (プローブの標識には、アマシャム社のメガプライムDNAラベリングシステムを用いた) を用いたサザンプロット解析により、相同組換え体を検出した。その結果、144クローン中1クローンが相同組換え体であった。野生型T2F細胞ではHindIII消化により約10kbの位置にバンドが検出された。相同組換え体においてはこのバンドが消失し、新たに約5kbの位置にバンドが検出された。このことから相同組換えにより目的の部位にloxP配列が挿入されたことが確認された。

(2) loxP配列挿入細胞株の取得（その2）

マウスCyp3aクラスターの一端にloxP配列を挿入した細胞株が1クローンしか得られなかつたことから再度相同組換え体の単離を行つた。

ターゲティングベクターploxP3aUPを15 μ g用いた以外は、前記（1）と同様にして、エレクトロポレーションによりマウスES細胞TT2Fへ導入した。

エレクトロポレーション後、通常のES培地（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995）で24時間培養し、その後G418（ギブコ）300 μ g/ml（見かけ濃度）を含む培地中で約1週間選択培養した。生じたG418耐性コロニー392個をピックアップし、フィーダー細胞播種済み24穴プレートでコンフルエントになるまで培養した後、フィーダー細胞播種済み12穴プレートに播種した。12穴プレートで2日間培養後、トリプシン処理により細胞を回収し、その3/4を-135°Cにて凍結保存した。残りの1/4の細胞はゲノムDNA取得用としてゼラチンコートした12穴プレートに播種した。その他のES細胞の取り扱いの具体的な手順はW097/07671、W098/37757に記載の方法に従つた。

ゲノムDNAの抽出は、Puregene DNA Isolation Kit (Gentra System社)を用いて行った。抽出したゲノムDNAを制限酵素HindIII（ペーリンガー）で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、サザンハイブリダイゼーションにより、相同組換え体（ES/loxP3aUPと呼ぶ）の同定を行つた。ターゲッティングベクターploxP3aUPと相同組換えが起こつたクローンを検出するためのサザンプロット用プローブは、（1）と同じものを使用した。

上記プローブ（プローブの標識には、アマシャム社のメガプライムDNAラベリングシステムを用いた）を用いたサザンプロット解析により、相同組換え体を検出した。その結果、392クローン中2クローンが相同組換え体であった。野生型TT2F細胞ではHindIII消化により約10kbの位置にバンドが確認された。相同組換え体においてはこのバンドが消失し、新たに約5kbの位置にバンドが検出された（図6参照）。このことから相同組換えにより目的の部位にloxP配列が挿入されたことが確認された。

実施例9 相同組換え体ES細胞(ES/loxP3aUP)からのキメラマウス作製

実施例8(2)で得られた相同組換え体TT2F細胞株(ES/loxP3aUP)を、実施例3に示したCYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片保有ES細胞を用いたキメラマウスの作製と同様にしてキメラマウスを作製した。すなわち、実施例8(2)で得られたES/loxP3aUPである115、305の2クローンについて、それぞれMCH(ICR)(日本クレア)雌雄マウスの交配により得られる8細胞期胚に、胚あたり10~20個注入した。ES細胞培地(W097/07671)で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウスの子宮に、片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。115クローンについては、855個のインジェクション胚を仮親マウスの子宮に移植して29匹のキメラマウスを獲得し、ES/loxP3aUPの体細胞への寄与率(キメラ率)においても100%に近い個体を得た。一方、305クローンについては、429個のインジェクション胚を仮親マウスの子宮に移植して1匹のキメラマウスを得た。この結果、キメラ作製効率ならびにキメラ率の観点から115クローンが305クローンに比してキメラ形成能において優れていると判断し、以降の実験に供することとした。

実施例10 マウスES細胞Cyp3a遺伝子クラスターの両端にloxP配列を挿入した細胞株の取得

実施例8(2)で得られた相同組換え体ES/loxP3aUP(マウスcyp3a遺伝子クラスター中のcyp3aY遺伝子領域にloxP配列が挿入されたもの)のうちキメラ形成能の高い115クローンについて、ターゲティングベクターploxP3aDOWNを用いて実施例8と同様にエレクトロポレーションを行った。まず、ターゲッティングベクター-ploxP3aDOWNを制限酵素SrfI(東洋紡)で線状化し、従来の方法(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995)に従い、マウスES細胞TT2Fへ導入した。具体的には、TT2F細胞をトリプシン処理し、 2.5×10^7 個/mlとなるようにHBS(HEPES-buffered saline)に懸濁してから、ベクター15μgを加え、ジーンバルサー(バイオラッド)を用いて、250V, 960μFの条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後、通常のES培地(相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、

1995) で24時間培養し、その後ピューロマイシン(シグマ)0.75 μ g/mlを含む培地中で約1週間選択培養した。生じたピューロマイシン耐性コロニー348個をピックアップし、フィーダー細胞播種済み24穴プレートで3日間培養した後、フィーダー細胞播種済み12穴プレートに播種した。12穴プレートで2日間培養後、トリプシン処理により細胞を回収し、その3/4を-135°Cにて凍結保存した。残りの1/4の細胞はゲノムDNA取得用としてゼラチンコートした12穴プレートに播種した。その他のES細胞の取り扱いの具体的な手順はW097/07671、W098/37757に記載の方法に従った。実施例8と同様にしてピューロマイシン耐性クローンからゲノムDNAを抽出してササンハイブリダイゼーションにより相同組換え体(ES/loxP3aUP+DOWN)の同定を行った。

ゲノムDNAの抽出は、Puregene DNA Isolation Kit (Gentra System社)を用いて行った。抽出したゲノムDNAを制限酵素XhoI / XbaI、およびXhoI / EcoRI(ベーリンガー)で切断し、アガロースゲル電気泳動で分離後、ササンハイブリダイゼーションにより、相同組換え体(ES/loxP3aUP+DOWNと呼ぶ)の同定を行った。ターゲッティングベクターploxP3aDOWNと相同組換えが起こったクローンを検出するためのササンプロット用プローブとして、ターゲッティングベクターploxP3aDOWN内部のGFPをコードしているDNA断片(約700塩基対)を用いた。このDNA断片はプラスミドpGreen Lantern(ギブコ)から制限酵素NotI(ベーリンガー)で切り出すことにより得た。

上記プローブ(プローブの標識には、アマシャム社のメガプライムDNAラベリングシステムを用いた)を用いたササンプロット解析により、相同組換え体を検出した。その結果、348クローン中3クローンが相同組換え体であった。野生型T-T2F細胞ではGFP配列を有していないため本プローブとハイブリダイズするバンドは確認されなかった。相同組換え体においてはXhoI/XbaI消化により約9kbの位置にバンドが確認され、さらにXhoI/EcoRI消化により約7kbの位置にバンドが検出された(図7参照)。このことから相同組換えによりマウスCyp3a遺伝子クラスター両端にloxP配列が挿入されたことが確認された。

実施例11 相同組換え体ES細胞(ES/loxP3aUP+DOWN)からのキメラマウスの作

製

実施例 10 で得られた相同組換え体TT2F細胞株 (ES/loxP3aUP+DOWN) がキメラ形成能を実際に保持しているかを確認するため、相同組換え体TT2F細胞株 (ES/loxP3aUP+DOWN) を用いたキメラ作製実験を実施例 9 と同様にして行った。すなわち、実施例 10 で得られたES/loxP3aUP+DOWNである124、125および147の3クローンについて、それぞれMCH(ICR)（日本クレア）雌雄マウスの交配により得られる8細胞期胚に、胚あたり10～20個注入した。ES細胞培地 (W097/07671) で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウスの子宮に、片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。124クローンについては、442個のインジェクション胚を仮親マウスの子宮に移植して8匹のキメラマウスを獲得し、ES/loxP3aUP+DOWNの体細胞への寄与率（キメラ率）においても100%に近い個体を得た。一方、125および147クローンについては、それぞれ479および204個のインジェクション胚を仮親マウスの子宮に移植し、それぞれ3匹ずつのキメラマウスを得た。この結果、キメラ作製効率ならびにキメラ率の観点から124クローンが他のクローンに比してキメラ形成能において優れていると判断し、以降の実験に供することとした。

実施例 12 マウスマウスES細胞Cyp3a遺伝子クラスター欠失細胞株の取得

以上の2回のターゲティング実験により得られたES細胞株ES/loxP3aUP+DOWN（マウスマウスcyp3a遺伝子クラスターの両末端にloxP配列が挿入されたもの）のうちキメラ形成能が高かった124クローンに対して、Cre組換え酵素発現ベクターpBS185（ギブコ）をトランスフェクションした。これによって、マウスマウス内在性cyp3a遺伝子クラスターの両末端に存在するloxP配列間で部位特異的組換えが起こり、結果的にCyp3a遺伝子クラスターが欠失すると期待できた。基本的な手順は上記の実施例 8 に従って行った。

ES細胞株ES/loxP3aUP+DOWNをトリプシン処理し、 1.0×10^7 個 /mlとなるようにHBSに懸濁してから、30 μgのpBS185ベクターを加え、ジーンバルサーを用いて上記実施例 8 と同条件でエレクトロポレーションを行った。その後、100mmシャー

レ1枚に播種した。期待通りのloxP間組換えが起こっている場合にはベクター中のGFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子が発現し、蛍光発光によって検出可能と考えられた。このことから72時間培養後、FACS (蛍光活性化セルソータ) により、GFP陽性細胞集団を分離した。

FACSによるGFP陽性細胞の分離は以下の手順で行った。Cre発現ベクターpBS185導入から72時間培養後、トリプシン処理により細胞をディッシュから剥離し、ES用DMEMで懸濁後、15mlチューブに移して1000rpm、5分間遠心した後、上清を吸引した。チューブをタッピングした後、ES用DMEM 10mlで細胞を再懸濁し、ゼラチンコートした100mmディッシュに播種し約一時間培養した。その後培地を静かに回収し、1000rpm、5分間遠心した。遠心後、上清を吸引し、細胞塊をタッピングしてほぐし、ソーティングバッファー (PBS / EDTA, 5% FCS) 4mlに懸濁した。懸濁後、セルストレイナーキャップ付きチューブ (ファルコン) のメッシュフィルターを通し、FACSへセットした。FACSにより分離されたGFP陽性細胞集団はベニシリン、ストレプトマイシン含有ES用培地4mlに混和した後、フィーダー細胞があらかじめ播種された60mmディッシュに十分分離した数十のコロニーが出現するように播種した。播種後3時間の時点で培地の7割を静かに除き、新しいES用培地を同量加え、約一週間培養した。得られたコロニーは実施例8と同様に培養後ゲノムDNAを調製し、マウスCyp3aクラスター欠失細胞株であることをPCRにて確認した。

(マウスCyp3aクラスター欠失細胞株同定用プライマー)

センス(PGK-2) : 5'-TGTTCTCCTCTTCCTACTCTCC-3' (配列番号60)

アンチセンス(GFP-2) : 5'-TGAAGGTAGTGACCAGTGTTGG-3' (配列番号61)

PCRの反応液は、10×Ex Taq Buffer (宝酒造) 3μl、dNTP(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP、各2.5mM) (宝酒造) 4.8μl、各プライマー10pmol、ゲノムDNA約100ng、Ex Taq(5U/ml) (宝酒造) 0.3μlに滅菌蒸留水を添加して計30μlにして、PCR用チューブ (パーキンエルマー) に分注した。PCR反応液を調製する過程の操作は全て氷上にて行った。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 9600、パーキンエルマー) を85°Cにセットし、85°Cに達したことを確認してからチューブをセ

ットした。85°C 3分、94°C 1分のpre-PCRの後、98°C 10秒、59°C 30秒、72°C 30秒を1サイクルとして30サイクルの反応を行った。この結果、17クローン中16クローンで約200塩基対のバンドが検出され、マウスCyp3a遺伝子クラスターが欠失した組換え体（ES/△3a）であることが確認された。

実施例 13 組換え体ES細胞（ES/△3a）からのキメラマウス作製

実施例 9と同様にして実施例 1 2で得られた組換え体TT2F細胞株（ES/△3a）C 6クローンを用いてキメラ作製実験を行った。MCH(ICR)（日本クレア）雌雄マウスの交配により得られた8細胞期胚に、胚あたり10～20個のES/△3aを注入した。ES用DMEMで一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親MCHマウスの子宮に、片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植した。330個のインジェクション胚を移植し、10匹のキメラマウスを獲得した。

得られた10匹のキメラマウスのうちの3匹は生後10日で尾部の一部を採取し、その組織片よりPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System社) を用いてゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型としてPCRを行いマウスCyp3aクラスターが欠損したノックアウトマウスであることを確認した。得られたキメラマウスがノックアウトマウスであれば、Cyp3aクラスターの遺伝子座がヘテロに欠失した遺伝子型を示し、Cre-loxPによる欠失の際にPGKプロモーターとGFP遺伝子が連結すると予想された。ノックアウトマウスの確認のためのプライマーとして実施例 1 2と同様にマウスCyp3aクラスター欠失細胞株同定用プライマーPGK-2（配列番号 6 0）とGFP-2（配列番号 6 1）をそれぞれ用いた。

PCRの反応液は、10×Ex Taq Buffer（宝酒造）3μl、dNTP(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP、各2.5mM)（宝酒造）4.8μl、各プライマー10pmol、ゲノムDNA約100ng、Ex Taq(5U/ml)（宝酒造）0.3μlに滅菌蒸留水を添加して計30μlにして、PCR用チューブ（パーキンエルマー）に分注した。PCR反応液を調製する過程の操作は全て氷上にて行った。サーマルサイクラー（GeneAmp PCR system 2400、パーキンエルマー）を85°Cにセットし、85°Cに達したことを確認してからチューブをセットした。85°C 3分、94°C 1分のpre-PCRの後、98°C 10秒、59°C 30秒、72°C 30秒を1サイクルとして30サイクルの反応を行った。この結果、3匹のキメラマウ

スの全てにおいて約200塩基対のバンドが検出され、マウスCyp3a遺伝子クラスターが欠失したノックアウトマウスであることが確認された。

実施例14 ニワトリDT40細胞へのヒト7番染色体の導入

富塚ら (Nature Genet., 16:133-143, 1997) の方法に従い、約 10^8 個のヒト7番染色体を保持するマウスA9細胞H5からミクロセルを精製し、DMEM 5 mlに懸濁した。1~ 2×10^7 個のニワトリDT40細胞をDMEMで2回洗浄後、DMEM 5 mlに懸濁し、遠心したミクロセルに加え、1500 rpmで10分間遠心し、上清を完全に取り除いた。沈殿をタッピングにより十分ほぐし、PEG1500溶液（ベーリンガー）0.5 mlを加え、約2分間、十分攪拌した。その後、DMEM 10mlをゆっくり加え、1500 rpmで10分間遠心し、10%ウシ胎児血清（ギブコ、以下FBSで記す）、1%ニワトリ血清（ギブコ）、 10^{-4} M 2-メルカプトエタノール（シグマ）を添加したRPMI1640培地（ギブコ）中で培養した（以下、「DT40メディウム」と略記）。24時間後、培地を1 mg/mlのG418を含む培地（以下、G418-DT40メディウムと略記）に交換し、約3週間選択培養した。薬剤耐性コロニーからゲノムDNAを抽出してCYP3A4とMDR1を検出するためのプライマーを用いてPCRを行った。

(CYP3A4及びMDR1検出用プライマー)

センス : 5'-CTCAGAAACTGTCAAGCATGC-3' (配列番号62)

アンチセンス : 5'-CCTAAAGGAAACGAACAGCG-3' (配列番号63)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqボリメラーゼはEx Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は94°C1分の熱変性後、98°C 10秒、56°C 30秒、72°C 30秒を1サイクルとして35サイクル行った。その結果、約30クローン中、2クローンがCYP3A4とMDR1陽性であった。さらに、ヒトCOT1 DNAプローブを用いてFISHを行った結果、全長ヒト7番染色体が独立して存在していることが分かった。以上の結果から、全長ヒト7番染色体を保持するニワトリDT40細胞（以下、DT40-#7と略記）がクローニングできた。

実施例 15 カセットベクターploxPHyg、ploxPbsrの作製

ヒト染色体上にCre組換え酵素の認識配列であるloxP配列を挿入するためのカセットベクターploxPHyg、ploxPbsrを、以下のようにして作製した。尚、前述したように、期待通りの転座が起った細胞をポジティブセレクションできるように、前者のカセットベクターにはPGKプロモータが、後者にはこのPGKプロモータによって転写されるべきGFP遺伝子が含まれるように構築した。

まず、ploxPHygの作製について述べる。プラスミドpBluescript II SK(-)（東洋紡）を制限酵素EcoRV（ベーリンガー）で切断し、脱リン酸化酵素CIAP（仔牛小腸由来アルカリ脱リン酸化酵素、宝酒造）を用いて、50°Cで30分間反応し、切断末端を脱リン酸化した。これに、プラスミドpBS302（ギブコ）から制限酵素SphIとHindIII（ベーリンガー）で切り出してDNA Blunting kit（宝酒造）で平滑末端化したDNA断片を、DNA Ligation kit（宝酒造）を用いてライゲーションし、エシェリヒア・コリのコンピテントセルDH5（東洋紡）を形質転換した（プラスミドpBS302HS）。平滑末端化、ライゲーション及び形質転換は、各キットに添付のプロトコールに従って行った。

次に、このプラスミドpBS302HSを制限酵素SalI（ベーリンガー）で切断、脱リン酸化し、これにプラスミドpGKPuro（WHITEHEAD INSTITUTE, Dr. Peter W. Lairdから分与）から制限酵素SalIとXbaI（ベーリンガー）で切り出したPGKプロモータ断片をクローニングし、プラスミドpBSPGK302HSを得た。このプラスミドを制限酵素EcoRIとNotI（ベーリンガー）で切断し、平滑化脱リン酸化後、NotIリンカー（宝酒造）をライゲーションした（プラスミドpBSPGK302HSN）。

一方、プラスミド#1-133（京都大学医学部 武田俊一教授より分与）を制限酵素BamHI（ベーリンガー）で切断することによってハイグロマイシンB耐性遺伝子カセットを切り出し、末端を平滑化した。プラスミドpBSPGK302HSNを制限酵素SalI（ベーリンガー）で切断し平滑末端後、ハイグロマイシンB耐性遺伝子カセットをクローニングした（プラスミドploxPHyg）。

次に、ploxPbsrの作製について述べる。まず最初に、プラスミドpBluescript II SK(-)（東洋紡）のSacI部位に上記のようにしてSfiIリンカーを挿入した。Sf

ii リンカーは、以下の配列のオリゴDNAを合成し、5'末端をリン酸化した（合成はグライナーに委託）。

(SfiI リンカー)

5' -pGGCCGC [A/T]GCGGCC-3' (配列番号64)

このプラスミドを制限酵素BamHI（ベーリンガー）で切断、脱リン酸化し、これにプラスミドpBS302（ギブコ）から制限酵素BamHI（ベーリンガー）で切り出したDNA断片をクローニングした(pBSSfK302B)。プラスミドpGREEN LANTERN-1（ギブコ）のClaI部位に上記のようにSpeI リンカー（宝酒造）を挿入し、さらに制限酵素SpeI（ベーリンガー）で切り出すことによって得たGFP遺伝子カセット断片を、SpeIで切断後、脱リン酸化したプラスミドpBSSfK302Bにクローニングした(pBSSfK302BGFP)。このプラスミドを制限酵素XbaI（ベーリンガー）で切断し、平滑末端化後、プラスミド#1-134（京都大学医学部 武田俊一教授より分与）から制限酵素BamHI（ベーリンガー）で切り出し平滑末端化したDNA断片（プラストサイジンS耐性遺伝子カセット）をクローニングした(ploxPbsr)。カセットベクター-ploxPHyg、ploxPbsrの構造を図8に示した。

実施例16 ターゲティングベクターpBSCOL1A2lox(F)、pBSCOL1A2lox(R)の作製

ヒト7番染色体上のCYP3A遺伝子座の極セントロメア側に位置するpro alpha 2(I) collagenのゲノム領域(COL1A2)にloxP配列を挿入するためのターゲティングベクターpBSCOL1A2lox(F)、pBSCOL1A2lox(R)を以下のようにして作製した。尚、COL1A2の転写の方向がセントロメア→テロメアか、テロメア→セントロメアかが不明のため、(F)、および(R)の2方向のターゲティングベクターを作製することとした。

まず、COL1A2ゲノム領域を上記実施例14で得られたDT40-#7のゲノムDNAを鋳型として以下に示すプライマーを用いて増幅した。この際に、増幅されるPCR産物をベクターにクローニングできるよう、制限酵素KpnIの認識部位をプライマーの5'末端に付加した。

(COL1A2遺伝子領域増幅用プライマー)

センス : 5' -CGTAGGTACCCAAAGTCAGGCTTACATTTATTTGTG-3' (配列番号65)

アンチセンス : 5' -CGTAGGTACCGAGAATGAGTTGACCTTATCCATT-3' (配列番号66)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp2400を、TaqポリメラーゼはLA Taq (宝酒造) を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、65°C 15分を1サイクルとして35サイクル行った。PCR産物をフェノール・クロロホルムで2回処理した後、CHROMA SPIN-TE400 (クローンテック) でゲルfiltrationした。その後、制限酵素KpnI (ロシュ・ダイアグノスティックス) で切断し、フェノール・クロロホルムで2回処理した後、CHROMA SPIN-TE1000 (クローンテック) でゲルfiltrationした。一方、プラスミドpBluescriptIIのNotI部位を制限酵素NotI (ベーリンガー) で切断後、平滑化、セルフライゲーションすることにより欠失し、さらにSacII部位にSrfIリンクーを挿入したプラスミドベクター[pBS(N)Sr]を作製した。尚、SrfIリンクーには以下の配列のオリゴDNAを用いた。

(SrfIリンクー)

5' -pGCCCGGGC-3'

プラスミド[pBS(N)Sr]のKpnI部位に、上記のKpnI末端を持つCOL1A2遺伝子のPCR断片をクローニングしプラスミドpBSCOL1A2を作製した。このプラスミドを制限酵素StuI (ロシュ・ダイアグノスティックス) で切断、脱リン酸化後NotIリンクー (宝酒造) を挿入しpBSCOL1A2Notを作製した。一方、カセットベクターploxPHygのKpnI部位にNotIリンクー (宝酒造) を挿入し、制限酵素NotI (ベーリンガー) でloxP配列を含むDNA断片を切り出し、プラスミドpBSCOL1A2NotのNotI部位にクローニングしてプラスミドpBSCOL1A2loxを得た。loxP配列の方向がクローニングしたCOL1A2ゲノム断片と同方向のものを(F)、逆方向のものを(R)とした[pBSCOL1A2lox(F), (R)、図9]。

実施例17 カセットベクターpTELPuroの作製

ヒト染色体上にヒトテロメア配列を挿入するためのカセットベクターpTELPuroを、以下のようにして作製した。ヒトテロメア配列は、J.J.Harringtonら (Nature Genet., 15, 345-355, 1997) にならってPCRにより合成し、プラスミドpBluescript II SK(-) (東洋紡) のEcoRV部位にクローニングした (pTEL)。次にプラスミドpGKPuro (WHITEHEAD INSTITUTE, Dr. Peter W. Lairdから分与) のEcoRI部位をNotI部位に変え、制限酵素NotI (ベーリンガー) で切り出したDNA断片 (ピューロマイシン耐性遺伝子カセット) をプラスミドpTELのNotI部位にクローニングした (pTELPuro、図10)。

実施例18 ターゲティングベクターpTELPuro5.3(F)、pTELPuro5.3(R)の作製

ヒト7番染色体上のCYP3A遺伝子座クラスターの極テロメア側に位置するゲノム領域であるAF006752マーカー (AF006752) にヒトテロメア配列を挿入するためのターゲティングベクターpTELPuro5.3(F)、pTELPuro5.3(R)を以下のようにして作製した。尚、AF006752のシークエンス方向がセントロメア→テロメアか、テロメア→セントロメアかが不明のため、(F), および(R)の2方向のターゲティングベクターを作製することとした。

まず、AF006752遺伝子座のゲノム領域を上記実施例14で得られたDT40-#7のゲノムDNAを鑄型として以下に示すプライマーを用いてPCRによって増幅した。この際に、増幅されるPCR産物をベクターにクローニングできるように制限酵素Bam HIの認識部位をセンスプライマーの5'末端に付加した。

(AF006752遺伝子領域増幅用プライマー)

センス : 5'-CGTAGGATCCATGTTCTGGAATACTTGCTGTTATTAG-3' (配列番号67)

アンチセンス : 5'-CAAAACAAACACTATTATCACTTCACAA-3' (配列番号68)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp2400を、TaqポリメラーゼはLA Taq (宝酒造) を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は、94°C 1

分の熱変性後、98°C 10秒、65°C 15分を1サイクルとして35サイクル行った。得られた約8kbのPCR産物をフェノール・クロロホルムで2回処理した後、CHROMA SPIN-TE1000（クローンテック）でゲルfiltrationした。その後、制限酵素BamHI（ロシュ・ダイアグノスティックス）で切断し、フェノール・クロロホルムで2回処理した後、CHROMA SPIN-TE1000（クローンテック）でゲルfiltrationした。ゲルfiltration後のPCR産物を0.6%アガロースゲルで電気泳動後にアガロースゲルから約5.3kbのBamHI断片を切り出した。切り出したゲル片からGeneCleanII（Bio101）でPCR産物のBamHI断片を抽出し、プラスミドpTEL_PuroのBamHI部位にクローニングした。クローニングされたAF006752の5.3kbのゲノム断片がヒトテロメア配列と同方向のものを(F)、逆方向のものを(R)とした[pTEL_Puro5.3(F),(R)、図11]。

実施例19 ニワトリDT40細胞中でのヒト7番染色体の部位特異的切断

上記実施例14で得られたDT40-#7に上記実施例18で作製したターゲティングベクターpTEL_Puro5.3(F), (R)をトランスフェクションし、AF006752ゲノム領域にヒトテロメア配列を挿入することによって、その挿入部位で7番染色体を切断することを試みた。

DT40-#7の培養は、実施例14と同様にG418-DT40メディウム中で行った。約10⁷個のDT40-#7をFBS無添加のRPMI1640培地で一回洗浄し、0.5mlのFBS無添加RPMI1640培地に懸濁し、制限酵素SfiI（東洋紡）で線状化したターゲティングベクター-pTEL_Puro5.3(F)あるいはpTEL_Puro5.3(R)を25-30μg加えエレクトロポレーション用のキュベット（バイオラッド）に移し、室温で10分間静置した。キュベットをジーンパルサー（バイオラッド）にセットし、550V、25μFの条件で電圧印加した。室温で10分間静置後、DT40メディウム中で24時間した。24時間後、ピューロマイシン（0.3 μg/ml）を含むDT40メディウム（以下、Puro-DT40メディウムと略記）に培地を交換し、96穴培養プレート5枚に分注して約2週間選択培養を行った。ピューロマイシン耐性クローンからPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System社) を用いてゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを制限酵素SphI（宝酒造）、HpaI（宝酒造）およびXbaI（東洋紡）で処理し、0.8%アガロースゲル中で電気泳動し、Gene Screen PlusTMハイブリダイゼーショントランスファー

メンブレン (NENTM Life Science Products , Inc.) ヘアルカリプロッティングした。このフィルターに対してAF006752中の遺伝子配列をPCRにより増幅したPS11プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い相同組換え体の同定を行った（図11）。PS11プローブの作製は以下のプライマーを用いてDT40-#7のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行い、そのPCR産物を鋳型としてランダムプライミングによる³²P標識DNAプローブを作製した（アマシャム、添付のプロトコールに従った）。

(PS11プローブ作製用プライマー)

PSF11 : 5' -AGCTTTGGGGACAAACAT-3' (配列番号69)

PSR11 : 5' -CAAAACAGTCTGAACAGACATTCC-3' (配列番号70)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp2400を、TaqポリメラーゼはEX Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は、93°C 5分の熱変性後、93°C 1分、54°C 1分、72°C 1分を1サイクルとして35サイクルを行った。サザンハイブリダイゼーションにより、非相同組換え体では約14.9kb、相同組換え体では約9.6kbのバンドが検出されると予測された（図11）。サザンハイブリダイゼーションの結果、ターゲティングベクターpTEL_Puro5.3(F)をトランスフェクションし得られたクローンでは145クローン中15クローンが、ターゲティングベクターpTEL_Puro5.3(R)トランスフェクションし得られたクローンでは143クローン中1クローンが目的の相同組換え体であった。（それぞれDF、DRクローンと呼ぶ）。

次に、相同組換え体Fクローン (DF87、DF117、DF124、DF137、DF141)、Rクローン (DR107)において、AF006752のゲノム領域で7番染色体の切断が起こっているか否かを、PCR及びFISH解析によって調べた。

(1) PCR解析

7番染色体上にあるCYP3Aファミリー遺伝子座近傍の多型マーカーの存在（図12）を次に挙げるプライマーを用いてPCRにより検出した。D7S479、D7S651、D7S

518、D7S658、D7S2420、D7S523検出用のプライマーはMouse MapPairs™（リサー・チ・ジェネティックス社）を用いた。PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp2400を、TaqポリメラーゼはEx Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用了。温度、サイクル条件は、95°C 2分の熱変性後、94°C 45秒、55–60°C 45秒、72°C 1分を1サイクルとして35サイクル行った。結果を表4に示した。○は陽性、×は陰性であることを示す。

表 4

	DF87	DF117	DF124	DF137	DF141	DR107	DT40-#7	DT40
D7S479	○	○	○	○	○	○	○	×
CYP3A4	○	○	○	○	○	○	○	×
D7S651	○	○	○	○	○	○	○	×
D7S518	○	○	×	×	×	○	○	×
D7S658	○	○	×	×	×	○	○	×
D7S2420	○	○	×	×	×	○	○	×
D7S523	○	○	×	×	×	○	○	×

ヒト7番染色体全長を保持するDT40-#7においては、全てのマーカが検出されたのに対して、相同組換え体Fクローン（DF124、DF137、DF141）においてはAF006752よりもテロメア側に位置するマーカ(D7S518、D7S658、D7S2420、D7S523)は全て消失しており、セントロメア側のマーカは全て検出された。一方、Rクローンにおいては全てのマーカが検出された。

(2) FISH解析

ヒト7番染色体がAF006752ゲノム領域で切断されていることを視覚的に判断するために、ターゲティングベクター中のピューロマイシン耐性遺伝子を検出できるpGKpuroプローブを用いたFISHを行った。方法は、黒岩ら (Nucleic Acid Research, 26:3447-3448, 1998) に従った。COT1染色（ローダミン標識、赤色）によりヒト7番染色体の大きさ、ならびに染色体バンドパターンから、DT40-#7に比べ

DFクローンおよびDRクローンにおいて7番染色体が断片化していることを確認した。さらに、pGKPuroプローブ由来のシグナル（FITC標識、黄色）が7q22付近に新たにできたテロメア一端に検出された。これにより、AF006752遺伝子座がヒト7番染色体断片のテロメア一端になっていることが示された。

以上のPCRならびにFISHの結果から、相同組換え体において、ヒト7番染色体がAF006752ゲノム領域で切断されていると考えられた。特にDF141クローンに関しては、PCRによってテロメア挿入部位であるAF006752遺伝子座のテロメア側のマーカの欠損が確認されたこと、FISHによって観察した50個の細胞分裂像の全てにおいて染色体の断片化が視覚的に確認されたことからトランケート体であると判断し、このDF141クローンを以降の実験に供することとした。

実施例 20 ニワトリDT40細胞中でのloxP_Hygカセットのヒト7番染色体上への部位特異的挿入

上記実施例19で得られたAF006752ゲノム領域で切断されたヒト7番染色体断片を保持するニワトリDT40細胞（DF141クローン）に、上記実施例16で作製したターゲティングベクターpBSCOL1A2lox(F)、(R)をトランスフェクションし、COL1A2ゲノム領域にloxP_Hygカセットを挿入することを試みた。

DF141クローンの培養は、Puro-DT40メディウム中で行った。トランスフェクションの手順は上記実施例19と同様にして行った。すなわち、約10⁷個の細胞をFBS無添加RPMI1640培地で一回洗浄し、0.5 mlのFBS無添加RPMI1640培地に懸濁し、制限酵素SrfI（東洋紡）または、SalI(ロシュ・ダイアグノスティックス)で線状化したターゲティングベクターpBSCOL1A2lox(F)、(R)を25～30 μg加え、エレクトロポレーション用のキュベット（バイオラッド）に移し、室温で10分間静置した。キュベットをジーンパルサー（バイオラッド）にセットし、550V、25 μFの条件で電圧印加した。室温で10分間静置後、DT40メディウム中で24時間した。24時間後、ハイグロマイシンB（1mg/ml）を含むDT40メディウム（以下、Hyg-DT40メディウムと略記）に培地を交換し、96穴培養プレート5枚に分注して約2週間選択培養を行った。ハイグロマイシンB耐性クローンから、Puregene DNA Isolation Kit (Gentra System社) を用いてゲノムDNAを抽出した。COL1A2部位における

る相同組換え体の同定は、以下のプライマーを用いてPCRにより行った（図9）。

(COL1A2部位相同組換え体同定用プライマー)

COLHR5 : 5' -TTTCTAGGAAACTGTAAGAAAGGTAAGAGT-3' (配列番号71)

COLHR6 : 5' -TGGTATTCACTTTAATATCACATTATCTCC-3' (配列番号72)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp2400を、TaqボリメラーゼはLA Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、85°C 3分、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、65°C 15分を1サイクルとして30サイクル行った。上記に示したCOLHR5およびCOLHR6のプライマーの組み合わせによるPCRでは、部位特異的に導入したloxPHygカセットを挟む形で増幅されるため（図9）、非相同組換え体では約8.5kbのバンドが検出されると考えられた。一方、相同組換え体では約14.1kbのバンドが検出されるか、あるいはloxPHygカセット中のβ-アクチンプロモーターに含まれるGCリッチな配列のためバンドが検出されないと予想された。PCRの結果、ターゲティングベクターpBSCOL1A2lox(F)をトランスフェクションして得られた168クローン中34クローン（TFクローンと呼ぶ）、ターゲティングベクターpBSCOL1A2lox(R)をトランスフェクションして得られた156クローン中32クローン（TRクローンと呼ぶ）においてPCR産物が増幅されず、相同組換え体であると考えられた。さらに、これら相同組換え体と考えられたTF、TRクローンから任意に数クローンを選抜し以下に示すプライマーの組み合わせでそれぞれPCRを行い再度、相同組換え体であることを確認した。

(TFクローン相同組換え確認用プライマー)

COLHR2 : 5' -TATCCTTTAAAGTTATTTAACACTCA-3' (配列番号73)

HYGR01 : 5' -ATGGTTCTACAAAGATCGTTATGTTATC-3' (配列番号74)

(TRクローン相同組換え確認用プライマー)

COLHR1 : 5' -ATTTATTATTGTCTGTTGTATCTTCCT-3' (配列番号75)

HYGR01 : 5' -ATGGTTCTACAAAGATCGTTATGTTATC-3' (配列番号76)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp2400を、TaqポリメラーゼはLA Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、85°C 3分、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、65°C 15分を1サイクルとして30サイクル行った。この結果、TFクローンでは4.3kbのバンドが、TRクローンでは8.1kbのバンドが検出され、相同組換え体であることが確認された（図9）。

実施例2.1 ターゲティングベクターpRNR2loxPbsrの作製

ヒト14番染色体上のRNR2遺伝子座にloxP配列を挿入するためのターゲティングベクターpRNR2loxPbsrを、以下のようにして作製した。まず、ヒトRNR2遺伝子座のゲノム領域を以下のプライマーを用いてPCRにより増幅した。

(RNR2遺伝子領域增幅用プライマー)

センス : 5' - TCGAGAATTCACTGGCACTATCTTTTGCCATC-3' (配列番号 77)

アンチセンス : 5' - TCGAGAATTCTGGAGAAAAGAACACACAAGGACTCGGTC-3' (配列番号 78)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはLA Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、68°C 15分を1サイクルとして35サイクル行った。PCR産物をプロテネースK（ギブコ）処理した後、CHROMA SPIN-TE400（クローンテック）でゲルfiltrationした。その後、制限酵素EcoRI（ベーリンガー）で切断しCHROMA SPIN-TE1000（クローンテック）でゲルfiltrationした。一方、プラスミドpBluescript IIのKpnI部位を制限酵素KpnI（ベーリンガー）で切断後、平滑化、セルフライゲーションすることにより欠失し、さらにNotI部位にSrfIリンクマークを挿入したプラスミドベクター[pBS(K)Sr]を作製した。尚、SrfIリンクマークには以下の配列のオリゴDNAを用いた。

(SrfI リンカー)

5' -pGCCCGGGC-3'

プラスミド[pBS(K)Sr]のEcoRI部位に、上記のRNR2遺伝子PCR断片をクローニングすることで、プラスミドpRNR2を作製した。一方、カセットベクターploxPbsrのSfiI部位にKpnIリンク（宝酒造）を挿入し、制限酵素KpnI（ベーリンガー）でloxP配列を含むDNA断片を切り出し、プラスミドpRNR2のKpnI部位にクローニングした。RNR2遺伝子は、テロメア→セントロメア方向に転写される（R.G.Wortonら、SCIENCE, 239:64-68, 1988）ことが報告されているので、クローニングしたRNR2遺伝子PCR断片の方向とloxP配列の方向とが逆向きのものを、ターゲティングベクターとして用いた（pRNR2loxPbsr、図13）。

実施例22 ニワトリDT40細胞中でのloxPbsrカセットのヒト14番染色体上への部位特異的挿入

ヒト14番染色体断片SC20を保持するニワトリDT40細胞（鳥取大学医学部 押村教授より分与）に上記実施例21で作製したターゲティングベクターpRNR2loxPbsrをトランスフェクションし、RNR2遺伝子座にloxPbsrカセットを挿入することを試みた。

上記と同様にして、制限酵素SrfI（東洋紡）で線状化したターゲティングベクターpRNR2loxPbsrをトランスフェクションし、プラストサイジンS（10 μg/ml）を含むDT40メディウム（以下、bsr-DT40メディウムと略記）中で約2週間選択培養した。耐性クローンからゲノムDNAを抽出して以下のプライマーを用いてPCRにより相同組換え体の同定を行った（図13）。

（相同組換え体同定用プライマー）

センス(RNR2-1) : 5'-TGGATGTATCCTGTCAAGAGACC-3' (配列番号79)

アンチセンス(STOP-3) : 5'-CAGACACTCTATGCCTGTGG-3' (配列番号80)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはLA Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、65°C 5分を1サイクルとして35サイクル行った。この結果、60クローン中8クローンにおいて予想通りの約2.5 kbのPCR産物が増幅さ

れ、相同組換え体が得られた（Rクローンと呼ぶ）。

実施例 23 ヒトCYP3A遺伝子クラスターを有するヒト人工染色体#7-HACの構築

一般的記載で記したように、マウス中でより安定にかつ効率良く完全なヒトCYP3A遺伝子群を発現させるために、COL1A2-CYP3A-AF006752telから成るヒト7番染色体断片をヒト14番染色体断片SC20上のRNR2遺伝子座に転座させることによって、ヒトCYP3A遺伝子クラスターを有するヒト人工染色体#7-HACを構築することを試みた。

まず、最初に上記実施例20で得られた相同組換え体TF、TRクローンを相同組換え体Rクローンと細胞融合することによって、ヒト7番染色体断片と14番染色体断片SC20断片の両者を保持するDT40ハイブリッドを作製した。

（1）ヒト7番染色体断片と14番染色体断片SC20断片の両者を保持するDT40ハイブリッドの作製

Rクローンはbsr-DT40メディウムで、TF、TRクローンはHyg-DT40メディウムで培養した。1~2×10⁷個のTFクローン及びRクローンを混合し遠心後、無血清RPMI1640培地で2回洗浄した。残量培地を完全に取り除いた後に、予め37°Cで保温しておいた50%PEG 1500（ロシュ・ダイアグノスティックス）0.5 mlを静かに加え、約2分間ピベットで激しく混合した。その後、無血清RPMI1640培地1 mlを1分間かけてゆっくり加え、続いて無血清RPMI1640培地9 mlを約3分間かけて加え、37°Cで10分間静置した。その後、1,200 rpmで5分間遠心して上清を除去し、DT40メディウム中で24~48時間培養した。

その後、プラスチックサイジンS（10 μg/ml）、ハイグロマイシンB（1 mg/ml）含有DT40メディウムに交換し、24穴培養プレート5枚に分注し、3~4週間培養した。同様にして、TRクローンとRクローンも細胞融合した。TFクローンとRクローンとの細胞融合から得られたハイブリッドおよびTRクローンとRクローンとの細胞融合から得られたハイブリッドからゲノムDNAを抽出して、以下のプライマーを用いてPCRを行い、ヒト14番、7番染色体の2本が保持されていることを確認した。

（ヒト7番染色体検出用プライマー）

3A4F7 : 5' -GCAAGACTGTGAGCCAGTGA-3' (配列番号81)

3A4R7 : 5' -GGCTGCATCAGCATCATCTA-3' (配列番号82)

(ヒト14番染色体検出用プライマー)

VH3F : 5' -AGTGAGATAAGCAGTGGATG-3' (配列番号83)

VH3R : 5' -CTTGTGCTACTCCCCATCACT-3' (配列番号84)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp2400を、TaqボリメラーゼはEx Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は、94°C 1～5分の熱変性後、98°C 30秒、54～58°C 30秒～1分、72°C 30秒を1サイクルとして40サイクル行った。この実験により、上記2組のプライマーにおいてPCR産物が得られることを確認した。以上の実験から、ヒト14番および7番染色体の2本を保持しているハイブリッドクローニングを確認した（TFクローニング×RクローニングをRTF、TRクローニング×RクローニングをRTRクローニングとそれぞれ呼ぶ）。

(2) RTF、RTRハイブリッドクローニングにおけるヒト7番染色体断片の14番染色体断片SC20への部位特異的転座

(2)-1 Cre組換え酵素安定発現ベクターpBS185hisDの構築

一般記載で記したように、ヒト染色体の部位特異的転座はCre-loxPシステムを用いることによって行う。このシステムにおいても、今回のように非相同染色体間での組換え効率は非常に低いことが予想されるため、Cre酵素を一過性ではなく安定発現させることを考え、以下のような発現ベクターpBS185hisDを構築した（図14）。

Cre組換え酵素発現ベクターpBS185（ギブコ）を制限酵素EcoRI（ベーリンガー）で切断し、BglIIリソマリントベクターを挿入した（pBS185Bg）。一方、ヒスチヂノール耐性遺伝子カセットを含むプラスミド#1-132（京都大学医学部 武田俊一教授より分与）から、制限酵素BamHI（ベーリンガー）でヒスチヂノール耐性遺伝子カセットを切り出し、pBS185BgのBglII部位にクローニングした（pBS185hisD）。

(2)-2 Cre-loxPシステムを用いたRMF、RMRハイブリッドクローニングにおけるヒト

7番染色体断片の14番染色体断片SC20への部位特異的転座

上記と同様にして、制限酵素KpnI（ペーリンガー）で線状化したCre組換え酵素安定発現ベクターpBS185hisDを、RTF、RTRハイブリッドクローンにそれぞれトランスフェクションし、ヒスチヂノール（1mg/ml）存在下で約2週間選択培養する。その後、ヒスチヂノール耐性細胞を6穴培養プレートに分注しゲノムDNAを抽出する。抽出したゲノムDNAをテンプレートとして以下に示すプライマーを用いてPCRを行い染色体間の組換えを確認する。

（組換え検出用プライマー）

センス(PGK) : 5'-ATAGCAGCTTGCTCCTTCG-3' (配列番号85)

アンチセンス(GFP) : 5'-TTCTCTCCTGCACATAGCCCC-3' (配列番号86)

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp2400を、TaqポリメラーゼはEx Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、61°C 30秒、72°C 1分を1サイクルとして35サイクル行う。これにより、図15に示すような約600bpのPCR産物が得られる。しかしながら、染色体間転座による組換えの効率は非常に低い（1000万分の1）ことが予測されることから、このPCRにより得られた産物をテンプレートとしたnested PCRを行い組換えを検出する。nested PCRはPGK（配列番号85）とGFP（配列番号86）のプライマーによって増幅されたPCR産物1μlをテンプレートとし、nested PCR用プライマーとして、前記マウスCyp3aクラスター欠失細胞株同定用プライマーと同じプライマー（配列番号60、61）を用いて、さらにPCRを行う。

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp2400を、TaqポリメラーゼはEx Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、59°C 30秒、72°C 30秒を1サイクルとして35サイクル行う。これにより、約200bpのPCRが得られた耐性細胞集団の中に転座した細胞が含まれていることが確認できる。この耐性細胞集団をさらに6穴培養プレート4

枚に分注し、ピューロマイシン（ $0.3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ）存在下で培養する。その後、6穴培養プレート中で増殖した細胞について上記のnested PCRによるセレクションとピューロマイシン存在下での培養を繰り返すことにより、ヒト人工染色体#7-HACを有する細胞を濃縮することができる。濃縮後の細胞プールを約 10^7 個になるまで培養し、5% FBSと $1\ \text{mg}/\text{ml}$ のプロビディアムアイオダイド（PI）を添加したPBS（リン酸緩衝溶液）4mlに懸濁し、FACSVantage（ベクトン・ディッキンソン）により解析する。前述したように、loxP間での組換え転座が起こるとGFP遺伝子が再構築され発現するので、転座を起こした細胞をFACSで検出できる。GFP陽性と思われる細胞画分のソーティングを数回繰り返すことによって、GFP陽性細胞をクローニングする。

さらに、GFP陽性クローナンに対して、ヒト14q ter特異的プローブ（ヒト14番染色体長腕テロメア領域を検出、FITC標識）とpGKpuroプローブ（ヒト7番染色体断片の長腕テロメア領域を検出、ローダミン標識）を用いたFISHを行い、同一染色体上の両末端テロメア領域にFITCシグナルとローダミンシグナルが検出されることを確認する。また、ヒト14番染色体特異的プローブとヒト7番染色体特異的プローブでFISHを行い、同一染色体上に両方のプローブ由来のシグナルが観察されることを確認する。

以上の実験から、GFP陽性クローナンにおいて期待通りの転座が起こり、同一染色体上にヒトCYP3A遺伝子クラスターとMDR遺伝子クラスターの両方が含まれる人工染色体#7-HACが構築されたと結論できる。

実施例24 DT40ハイブリッド細胞からのヒト人工染色体#7-HACのチャイニーズハムスターCHO細胞への導入

マウスES細胞へヒト人工染色体#7-HACを導入するために、まず、CHO細胞へ導入する。

上記GFP陽性DT40ハイブリッドをそれぞれ直径150 mmシャーレ8枚で培養し、コンフルエントになった時点で20% FBS、1% ニワトリ血清、 10^{-4}M 2-メルカプトエタノール、 $0.05\ \text{mg}/\text{ml}$ コルセミドを添加したRPMI1640培地に交換し、さらに36時間培養してミクロセルを形成させる。細胞を24 mlの血清RPMI1640培地に懸濁

し、予め100 mg/mlのポリL-リジンでコートした遠心用25 cm³フラスコ12本（コーニング）に2 mlずつ分注し、37°Cで1時間培養し、細胞をフラスコの底に付着させる。

培養液を除去し、予め37°Cで保温したサイトカラシンB (10 mg/ml, シグマ) 溶液を遠心用フラスコに満たし、34°C、8000 rpmで1時間の遠心を行う。ミクロセルを無血清DMEM培地に懸濁し、8μmフィルター及び5μmフィルターにて精製する。精製後、1700 rpmで10分間遠心し、無血清DMEM培地5 mlに懸濁する。一方、約10⁷個のCHO細胞をトリプシン処理によりはがし、無血清DMEM培地で2回洗浄し、無血清DMEM培地5 mlに懸濁する。再度、ミクロセルを1700 rpmで10分間遠心し、上清を除かずに先のCHO懸濁液5 mlを静かに重層する。遠心後、培養液を除去し、1:1.4 PEG溶液 [5 g PEG1000 (和光純薬)、DMSO (シグマ) 1 mlをDMEM 6mlに溶解] 0.5 mlを加え、約2分間ピベットで激しく攪拌する。その後、無血清DMEM培地10 mlを約3分間かけてゆっくり加え、37°Cで10分間静置する。遠心後、10% FBS添加F12培地（ギブコ）に細胞を懸濁し、24穴培養プレート10枚に分注し、37°Cで24時間培養する。その後、G418 800 mg/ml含有F12培地に交換し、3~4週間選択培養する。

G418耐性クローンからゲノムDNAを抽出してCYP3A4とVH3検出用プライマーを用いて、前述と同様の条件でPCRを行う。さらに、ヒト14番染色体、7番染色体特異的プローブを用いてFISHを行う。これらの結果から、目的のヒト人工染色体#7-HACを保持するCHO細胞クローンが得られたと結論できる。

実施例25 CHO細胞からの#7-HACのマウスES細胞への導入

#7-HACを保持するキメラマウスを作製するために、上記実施例24で得られた#7-HACを保持するCHO細胞からマウスES細胞へ導入する。

富塚ら (Nature Genet., 16:133-143, 1997) の方法に従い、約10⁸個の#7-HACを保持するCHO細胞からミクロセルを精製し、DMEM 5 mlに懸濁する。約10⁷個のマウスES細胞TT2Fをトリプシン処理により剥がし、DMEMで3回洗浄後、DMEM 5 mlに懸濁し、遠心したミクロセルに加え、1250rpmで10分間遠心し、上清を完全に取り除く。沈殿をタッピングにより十分ほぐし、1:1.4 PEG溶液 [5g PEG 1000

(和光純薬)、1 ml DMSO (シグマ) をDMEM 6 mlに溶解] 0.5 mlを加え、約1分30秒間、十分攪拌する。その後、DMEM 10mlをゆっくり加え、1250 rpmで10分間遠心し、30 mlのES培地に懸濁し、予めフィーダー細胞をまいた直径100 mmシャーレ (コーニング) 3枚に分注し、培養する。24時間後、300 mg/mlのG418を含む培地に交換し、約1週間選択培養する。薬剤耐性コロニーからゲノムDNAを抽出してCYP3A4とVH3検出用プライマーを用いて、前述と同様の条件でPCRを行う。さらに、ヒト14番染色体、7番染色体特異的プローブを用いてFISHを行う。これらの結果から、目的のヒト人工染色体#7-HACを保持するES細胞クローンが得られたと結論できる。

実施例26 ヒト人工染色体#7-HACを保持するキメラマウスの作製

上記実施例25で選られるES細胞クローンをICRまたはMCH (日本クレア) 雌雄マウスの交配により得られる8細胞期胚に胚あたり10~12個注入する。ES細胞用培地で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウスの子宮に、片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植し、キメラマウスを作製する。

産業上の利用可能性

本発明は、以下に示す効果を奏する。

- (1) ヒトP450遺伝子群を染色体レベルの大きさで導入したキメラ非ヒト哺乳動物を作製することにより、個体内でヒトP450を発現するマウスを提供することができる。
- (2) ヒトP450遺伝子群を染色体レベルの大きさで導入したキメラ非ヒト哺乳動物は、P450遺伝子をヒトにおける発現の主要な臓器である肝臓ならびに小腸に特異的に発現し、ヒトにおける薬物代謝に関する組織特異性を非ヒト哺乳動物個体内で再現することができる。
- (3) また、本発明の非ヒト哺乳動物は、ヒトP450遺伝子群を染色体レベルの大きさで導入しているため、発現の調節に必要な遺伝子配列もこれに含まれていると考えらる。このため、キメラ非ヒト哺乳動物では、ヒトのP450の発現を誘導する

薬剤で非ヒト哺乳動物個体内においてヒトP450の発現を誘導できる。

(4) キメラ非ヒト哺乳動物に限らず、その子孫についても上記の効果が得られるものと考えられる。

(5) さらに、カウンターパートとなる非ヒト哺乳動物内在性P450遺伝子が破壊されたノックアウト非ヒト哺乳動物は、ヒトP450遺伝子の機能について重要な知見を提供できるばかりでなく、これとヒトP450遺伝子群を導入した非ヒト哺乳動物あるいはその子孫と交配させてできた産仔では、特定のP450分子種に関して完全にヒト型化していると考えられる。よって、発現の組織特異性や薬物誘導また発現の割合だけでなく、代謝の機能についても特定のP450分子種に関して完全にヒト型化したヒトP450導入非ヒト哺乳動物を提供できると考えられる。

(6) この特定のP450分子種に関して完全にヒト型化したヒトP450導入非ヒト哺乳動物を用いれば、薬理効果や薬物代謝あるいは毒性といった薬物のヒトへの影響を実際にヒトに投与することなく研究あるいは予測することが可能である。

(7) キメラ非ヒト哺乳動物やその子孫または完全にヒト型化したヒトP450導入非ヒト哺乳動物の個体や、その組織、細胞から生物学的活性のあるヒトP450タンパクを得ることが可能である。このようなタンパクは、従来入手の困難なヒトP450タンパクを容易に提供できるばかりか、大腸菌に代表される細菌を用いた発現系では解決し得なかったリン酸化や糖鎖による修飾などに代表されるタンパクの修飾の面でもよりヒトの体内で生産されるP450に近いものを提供できる。

(8) また、上記非ヒト哺乳動物由來の組織や細胞を不死化して培養系で用いる場合、安定してヒトP450タンパクを供給できる。さらに、ヒトにおける薬物代謝の培養系における研究材料として利用が可能である。

請求の範囲

1. ヒトチトクロームP450遺伝子の少なくとも一つを保持し、同遺伝子は、同遺伝子産物の基質となる化合物により誘導発現されることを特徴とする非ヒト哺乳動物。
2. 前記ヒトチトクロームP450遺伝子がCYP3Aファミリーに属するものである請求項1記載の非ヒト哺乳動物。
3. 前記ヒトチトクロームP450遺伝子は、同遺伝子を含むYACベクターの導入又は同遺伝子を含む染色体断片を用いたミクロセル融合法により導入されたことを特徴とする請求項1記載の非ヒト哺乳動物。
4. キメラ動物である請求項3記載の非ヒト動物。
5. 請求項4記載の非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物と、請求項4記載の非ヒト動物との交配により得られ、ヒトチトクロームP450遺伝子を含む染色体断片を保持する非ヒト動物。
6. 前記ヒトチトクロームP450遺伝子のホモログである前記非ヒト哺乳動物固有のチトクロームP450遺伝子が破壊され、その固有の遺伝子の発現が低下又は消失した請求項1記載の非ヒト哺乳動物。
7. 前記非ヒト哺乳動物固有のチトクロームP450遺伝子の破壊が、Cre-loxPの系を用いて行われたものである請求項4記載の非ヒト哺乳動物。
8. マウスである請求項1～7のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物。
9. 請求項1～8のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物に由来し、ヒトチトクロームP450遺伝子が発現可能な細胞、又は同細胞を含む器官もしくは組織。
10. マウスのCyp3a遺伝子群の染色体上の配置を決定するための物理的地図を作製する方法であって、下記の工程を含む方法：

(a) マウスCyp3a遺伝子の各々を特異的に検出できるPCRプライマーまたはハイブリダイゼーション用のプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションにより、マウスBACライブラリーをスクリーニングする工程；

(b) 上記で選択されたBACクローンの末端塩基配列を決定し、同塩基配列に基づいてプライマー又はプローブを作製し、再度BACライブラリーをスクリーニングする操作を数回繰り返して、BACコンティグを作製する工程；及び

(c) 任意のマウスCyp3a遺伝子の全長cDNAプローブを作製し、同プローブを用いて上記BACコンティグに対して穏やかな条件でハイブリダイゼーションを行うことにより、Cyp3a遺伝子クラスターの両端を決定する工程。

11. 請求項10記載の方法により作製でき、マウスCyp3a遺伝子群の染色体上の配置を明らかにした物理的地図。

12. 請求項11記載の物理的地図に基づいてマウスCyp3a遺伝子クラスターの末端のそれぞれに相当するゲノムDNAをクローニングし、得られたクローン化断片のそれを、バクテリオファージP1由来の組換え酵素Creの認識配列であるloxP配列を含むベクター中に挿入することを含む、マウスCyp3a遺伝子群欠損用ターゲティングベクターの作製法。

13. 請求項12記載の方法により作製することができる一対のベクターであって、それぞれのベクターはマウス染色体に組み込まれ、前記酵素Creが存在するときのみにloxP配列間で相同組換えが起こり、Cyp3a遺伝子クラスター全体を欠失させることができる特徴とする、マウスCyp3a遺伝子群欠損用ターゲティングベクター。

14. 請求項13記載のベクターをマウスの分化多能性を保持する細胞に導入する工程と、酵素Creを発現させる工程を含む、マウス細胞のCyp3a遺伝子群を欠損させる方法。

15. 請求項14記載の方法により作製することができるマウス細胞であって、Cyp3a遺伝子群を欠損し、かつ、分化多能性を保持する細胞。

16. 請求項15記載のマウス細胞を分化させることを特徴とするCyp3a遺伝子を欠損したノックアウトマウスの作製方法。

17. 請求項16記載の方法により作製されるCyp3a遺伝子群を欠損したキメラマウス又はその子孫。

18. 請求項17記載のキメラマウス又はその子孫と、野生マウスとの交配により得られるCyp3a遺伝子群を欠損したマウス又はその子孫。

19. 請求項16記載のキメラマウスもしくはその子孫又は請求項17記載のマウスもしくはその子孫に由来する組織。

20. 請求項16記載のキメラマウスもしくはその子孫又は請求項17記載のマウスもしくはその子孫に由来する細胞。

21. 請求項8記載のマウス又はその子孫を、請求項17記載のキメラマウスもしくはその子孫または請求項18記載のマウスもしくはその子孫と交配させることにより作製されたマウス又はその子孫であって、ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持し、マウスCyp3a遺伝子群を欠損したマウス又はその子孫。

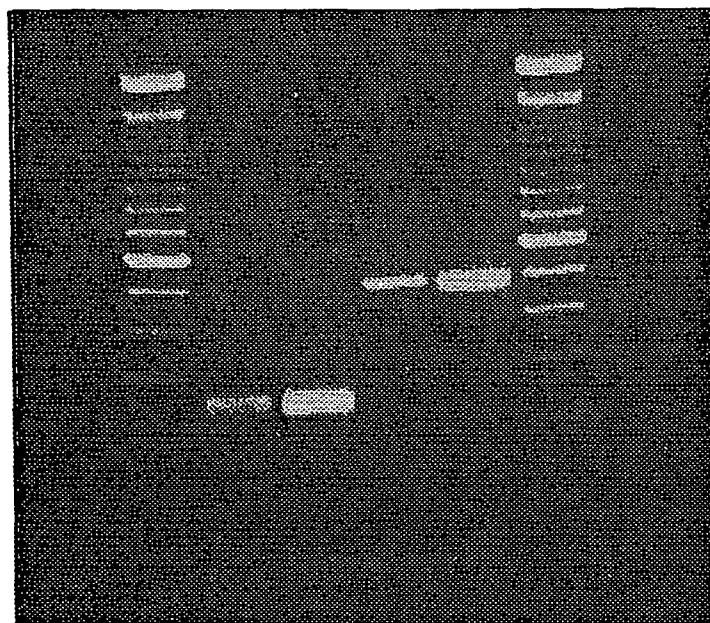
22. 請求項8記載のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞を培養し、これらが保持するヒトチトクロームP450遺伝子を発現させることによって、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450を産生させ、同ヒトチトクロームP450を回収することを特徴とする、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450の製造方法。

23. 請求項21記載のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞を培養し、これらが保持するヒトチトクロームP450遺伝子を発現させることによって、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450を産生させ、同ヒトチトクロームP450を回収することを特徴とする、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450の製造方法。

24. 請求項8記載のマウスもしくはその子孫又は請求項21記載のマウスも

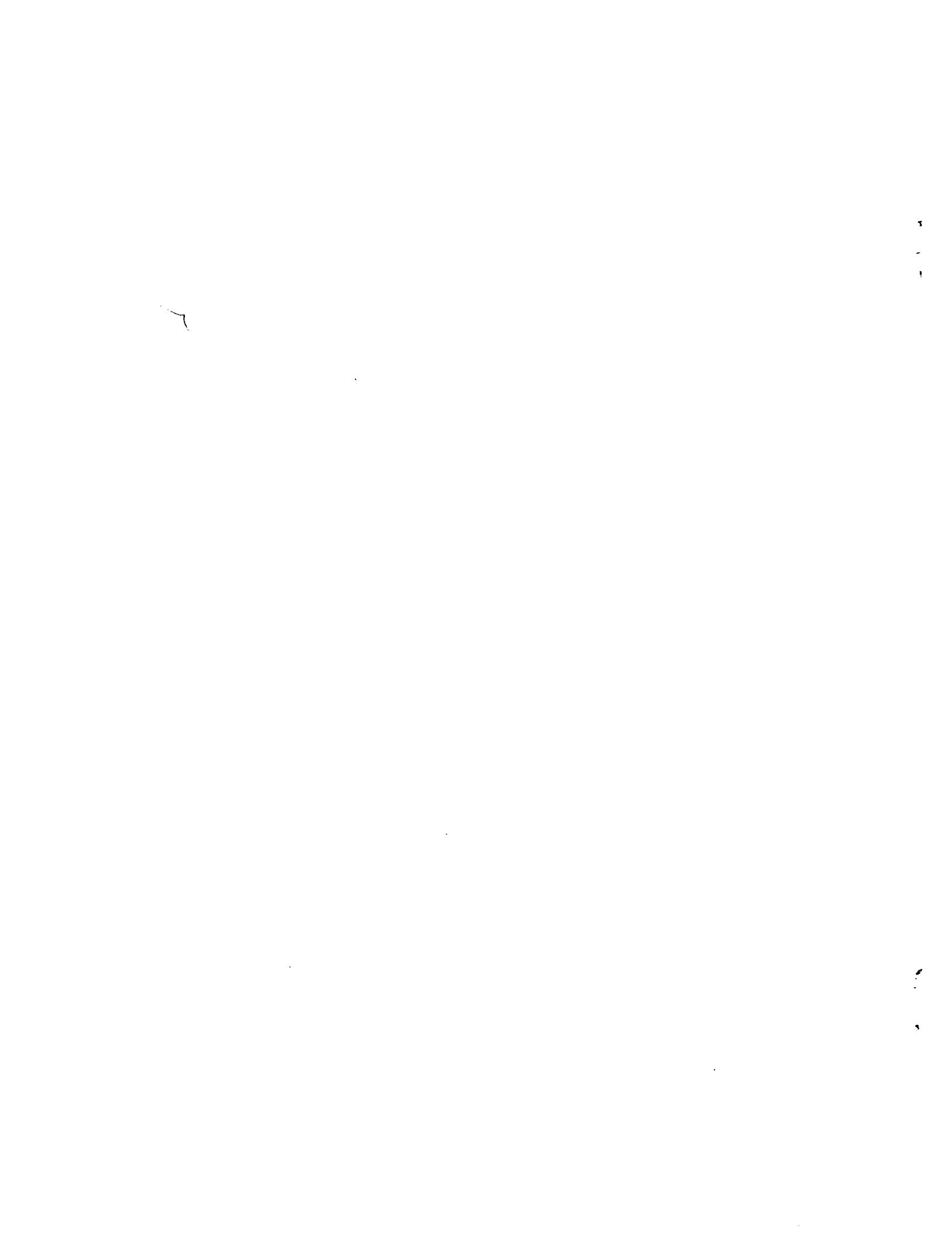
しくはその子孫の個体、組織又は細胞に薬物を投与することを特徴とする前記薬物の薬理作用及び／または代謝を試験する方法。

① ② ③ ④ ⑤ ⑥



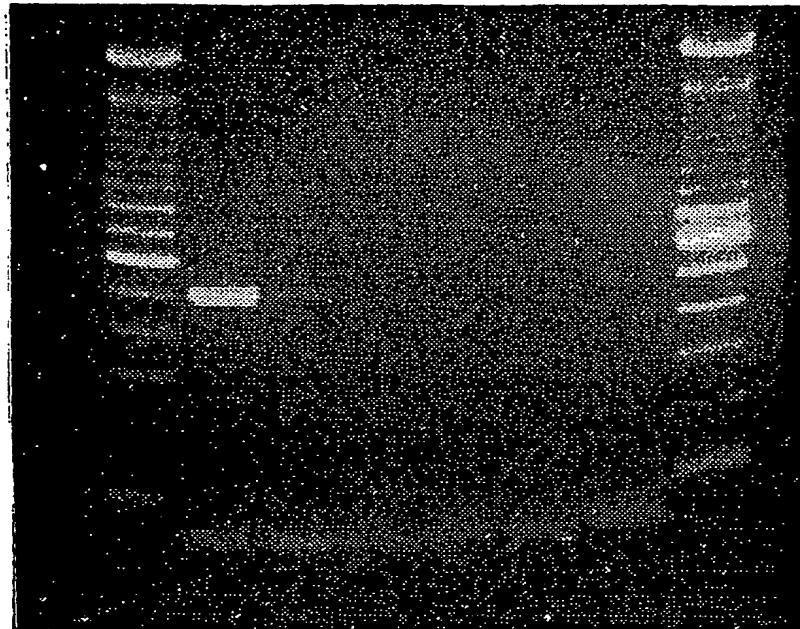
F / G. 1

差替え用紙(規則26)



2/16

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧

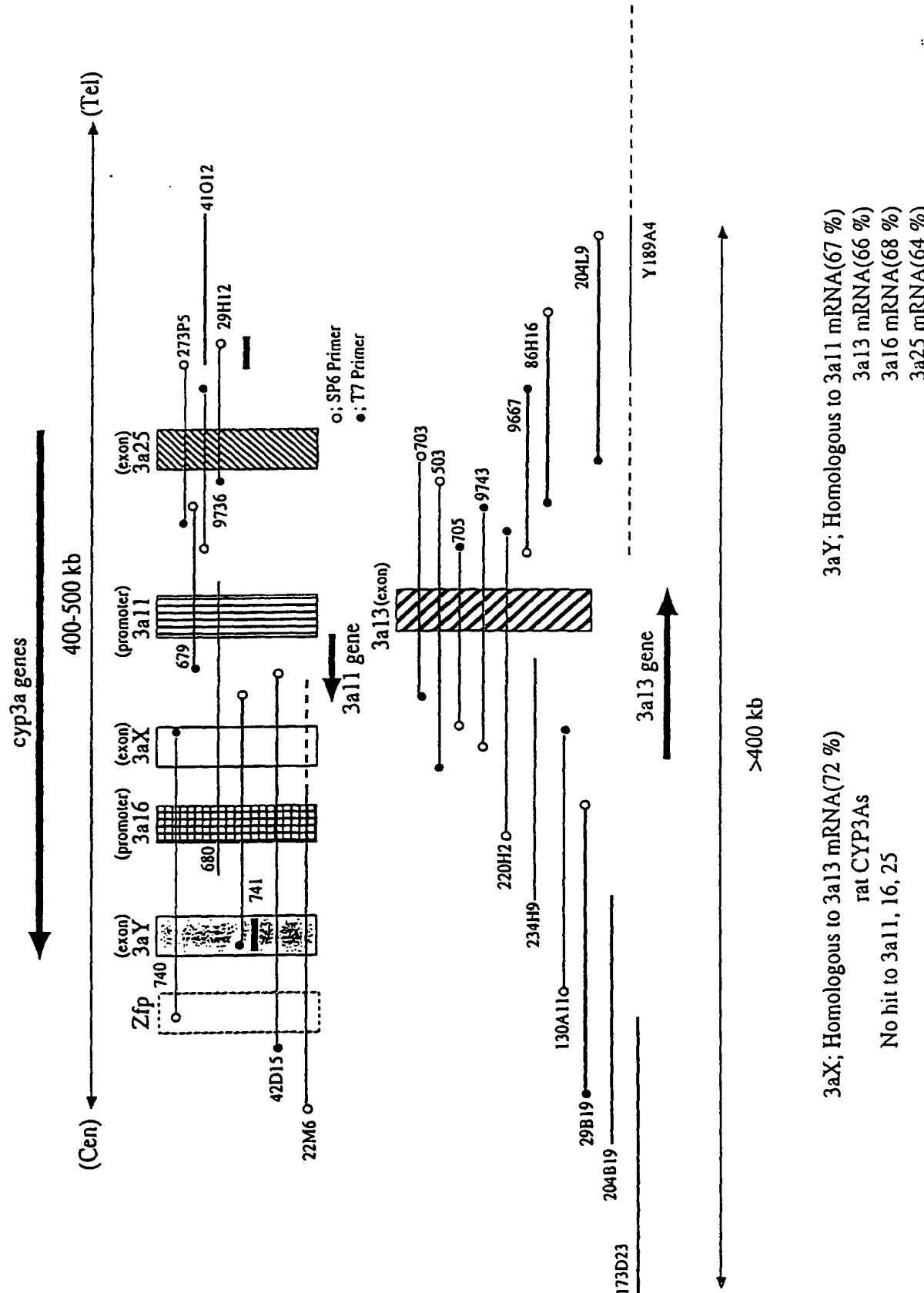


F / G. 2

差替え用紙(規則26)



F / G. 3



差替え用紙(規則26)

3aX: Homologous to 3a13 mRNA(72 %)
rat CYP3As
No hit to 3a11, 16, 25

3aY: Homologous to 3a11 mRNA(67 %)
3a13 mRNA(66 %)
3a16 mRNA(68 %)
3a25 mRNA(64 %)



F / G. 4

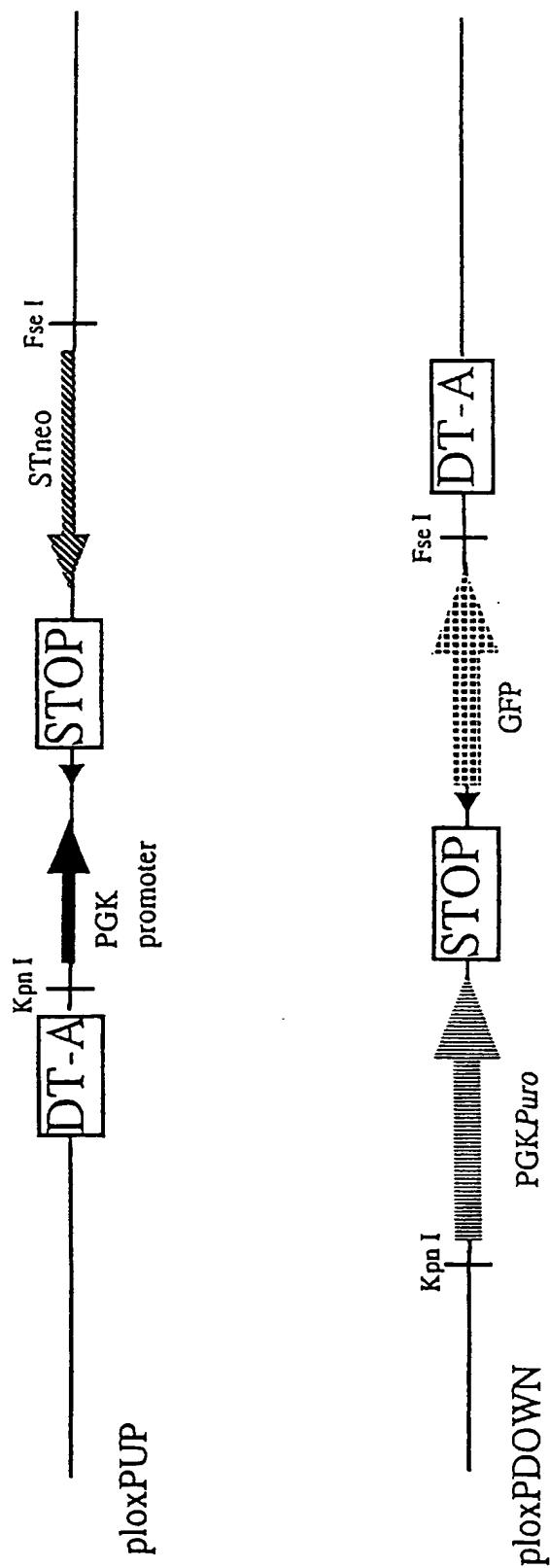
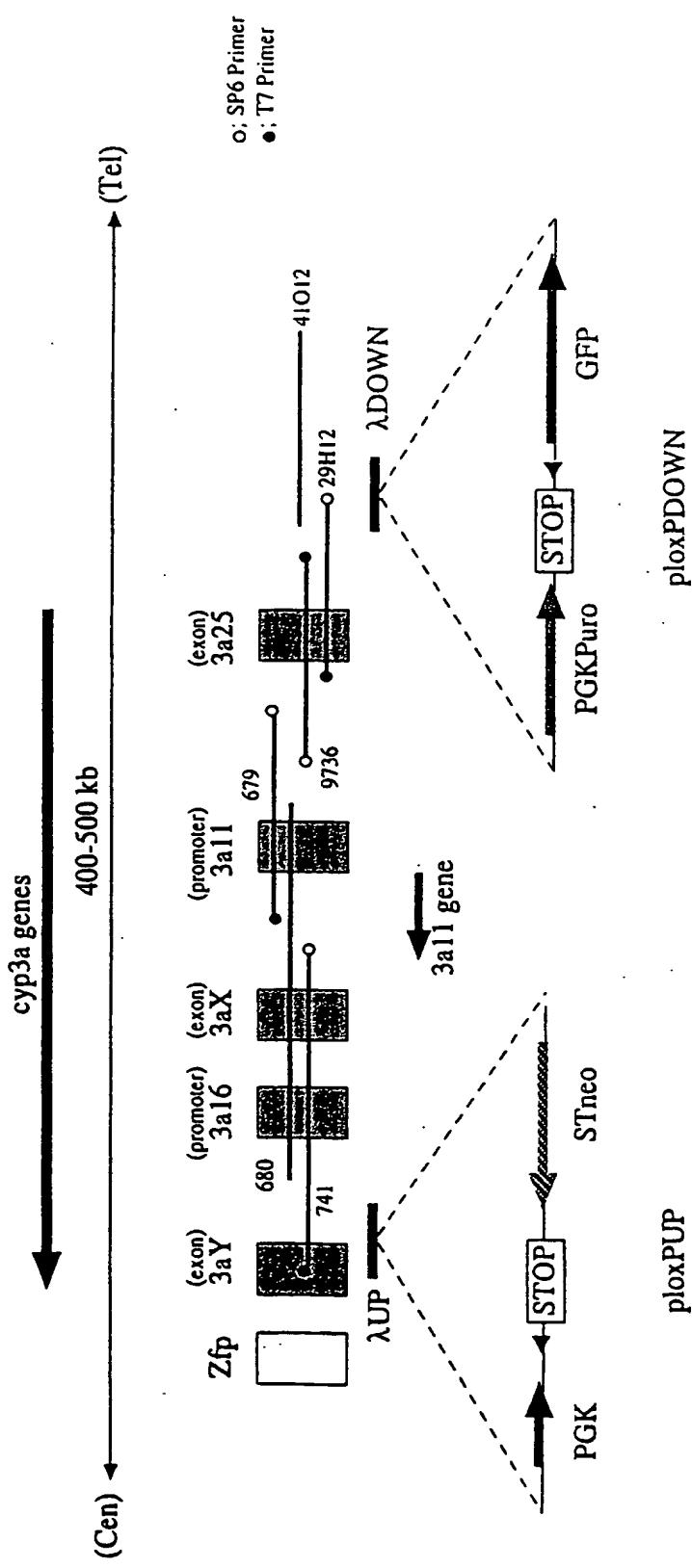
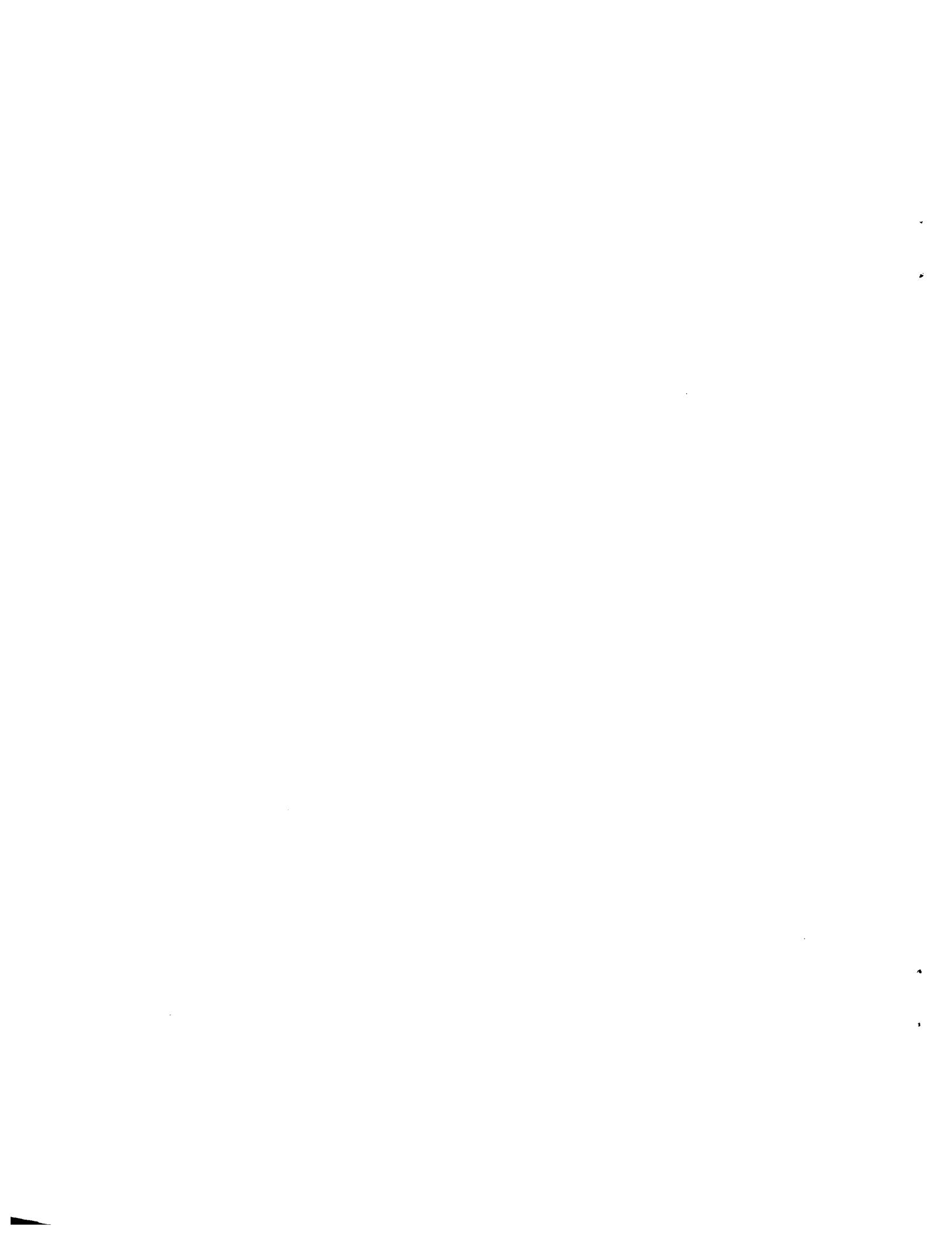


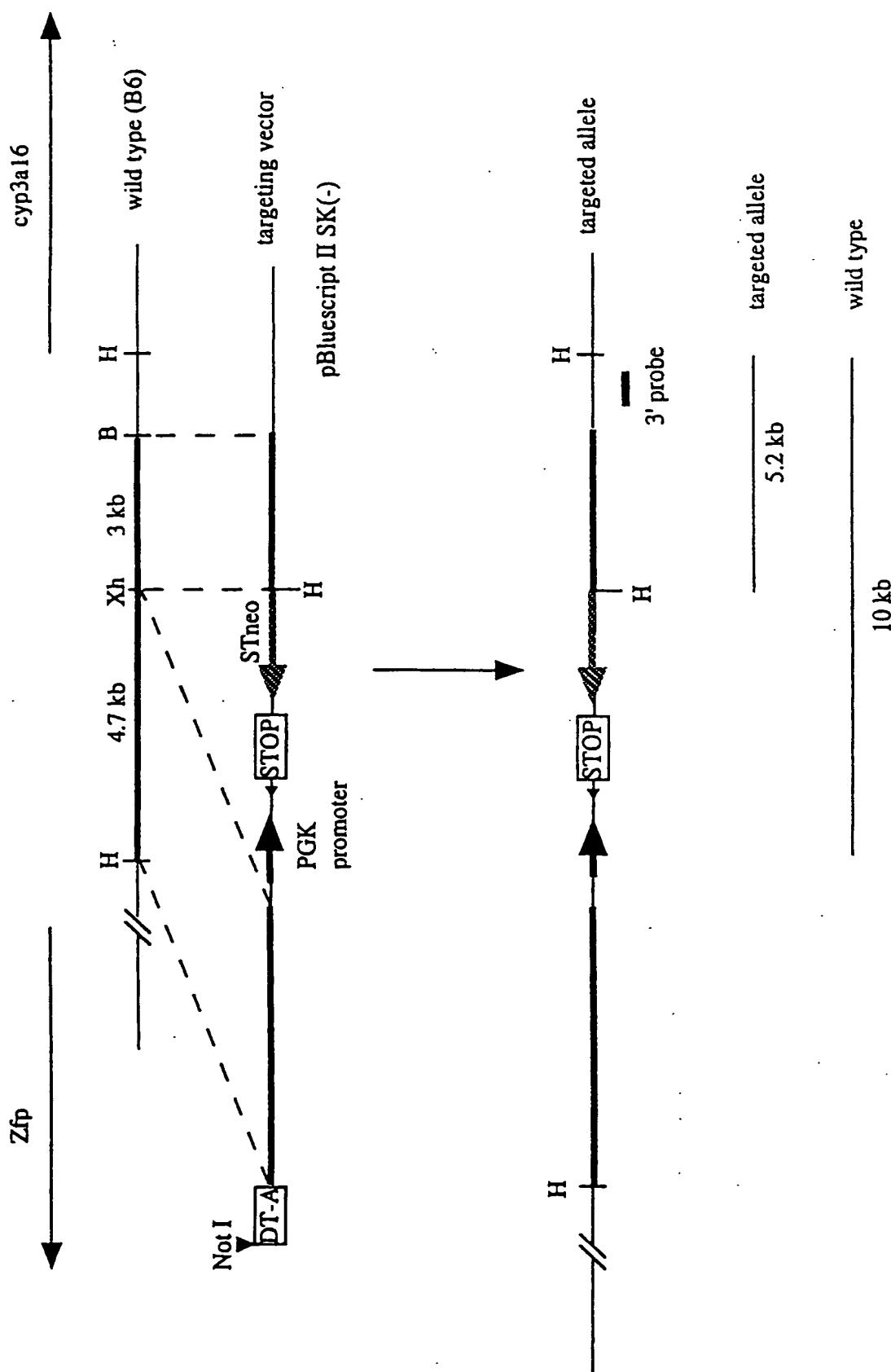


FIG. 5

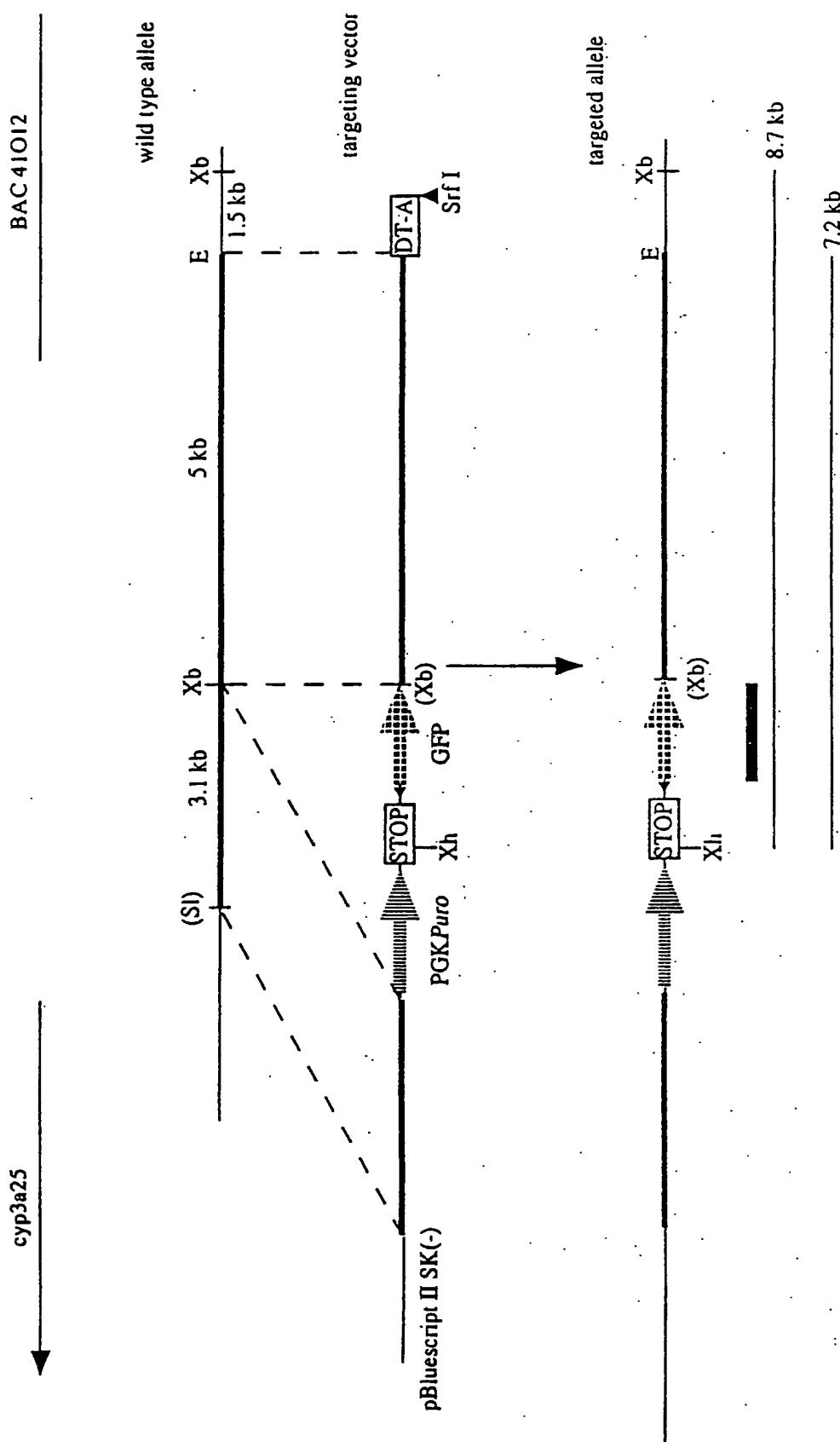




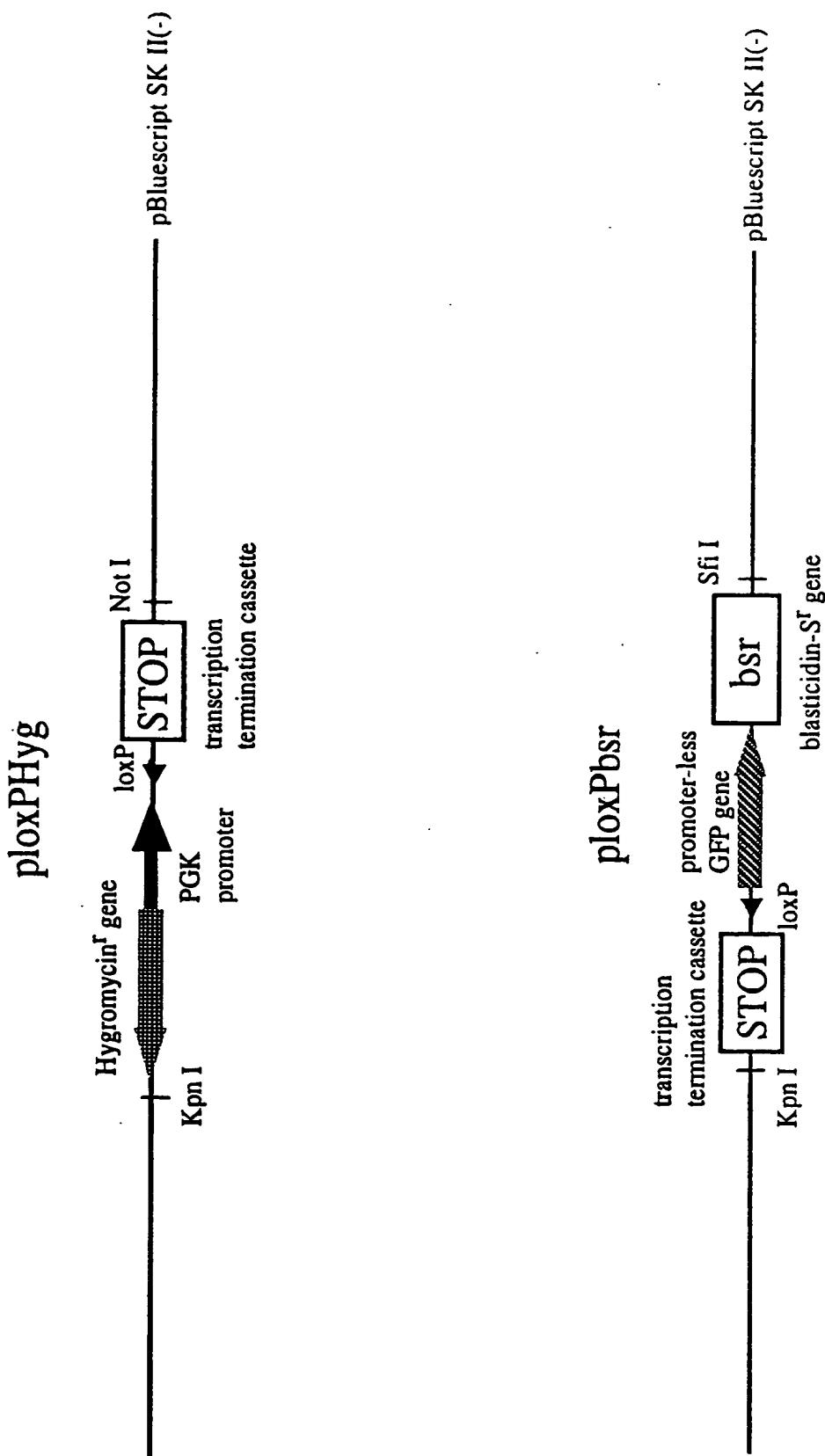
F / G. 6



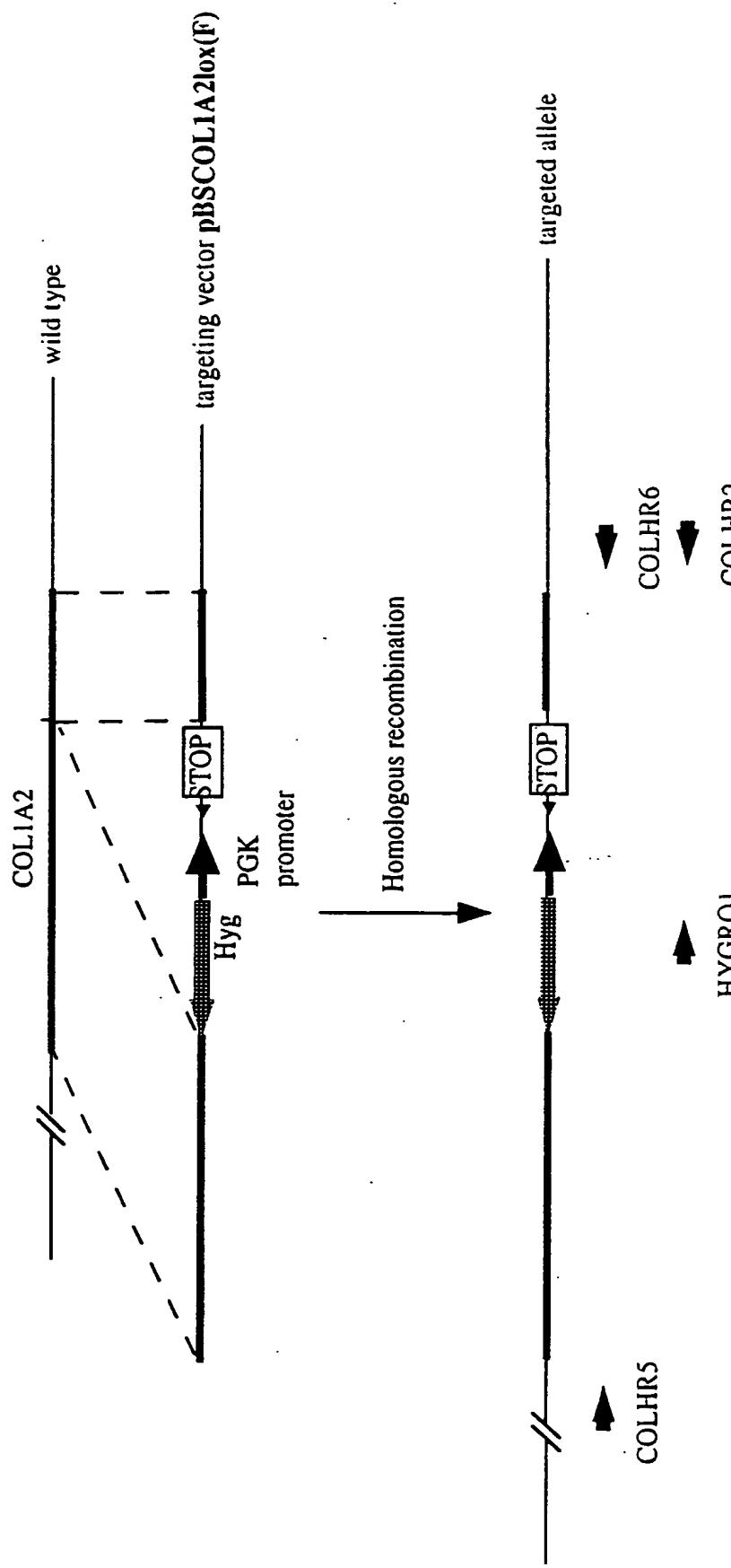
F / G. 7







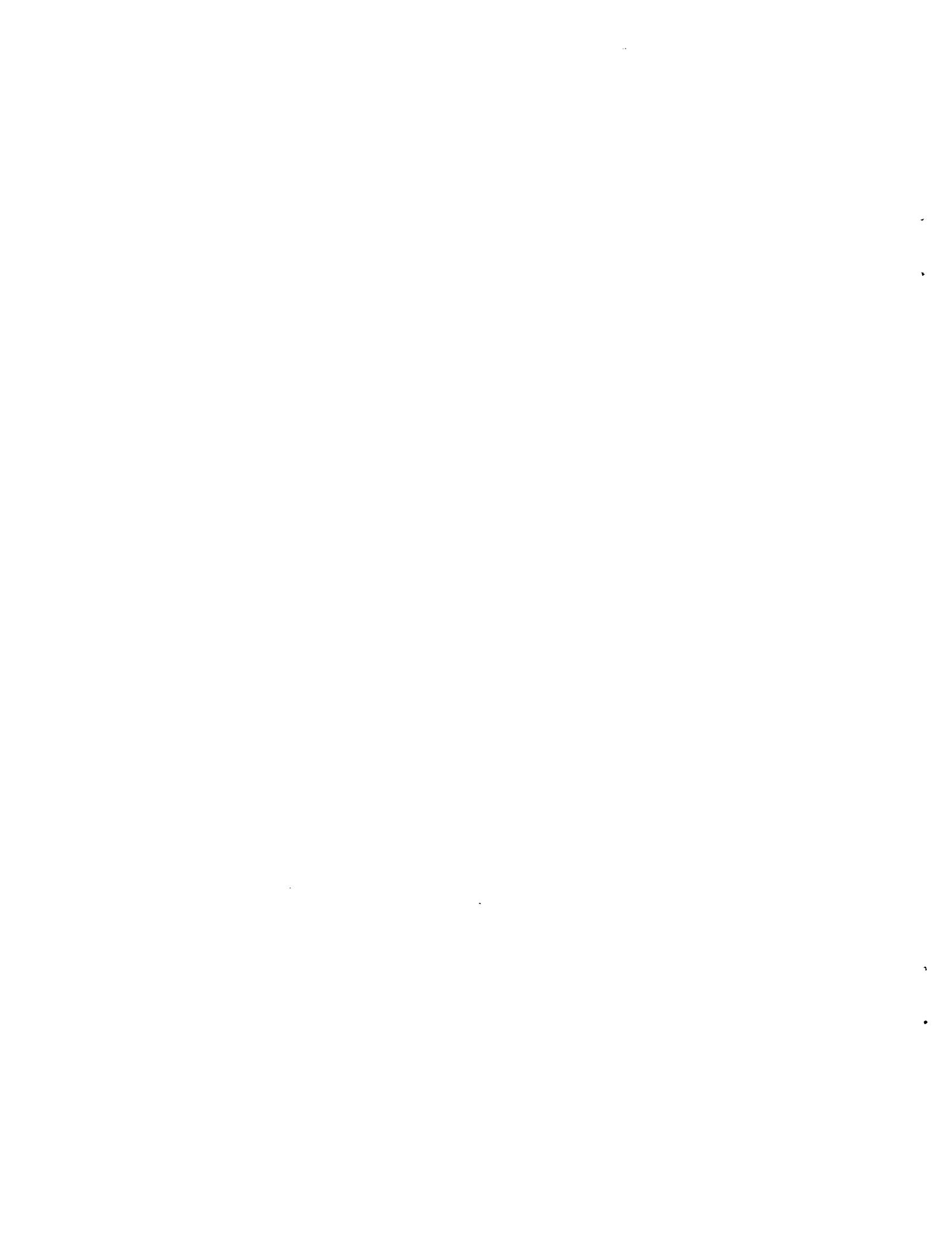




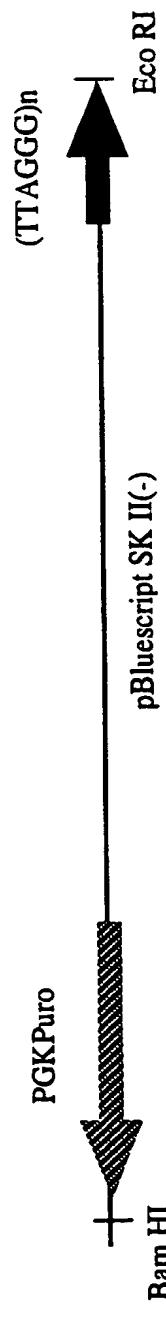
差替え用紙(規則26)

Primers for identification of homologous recombinants

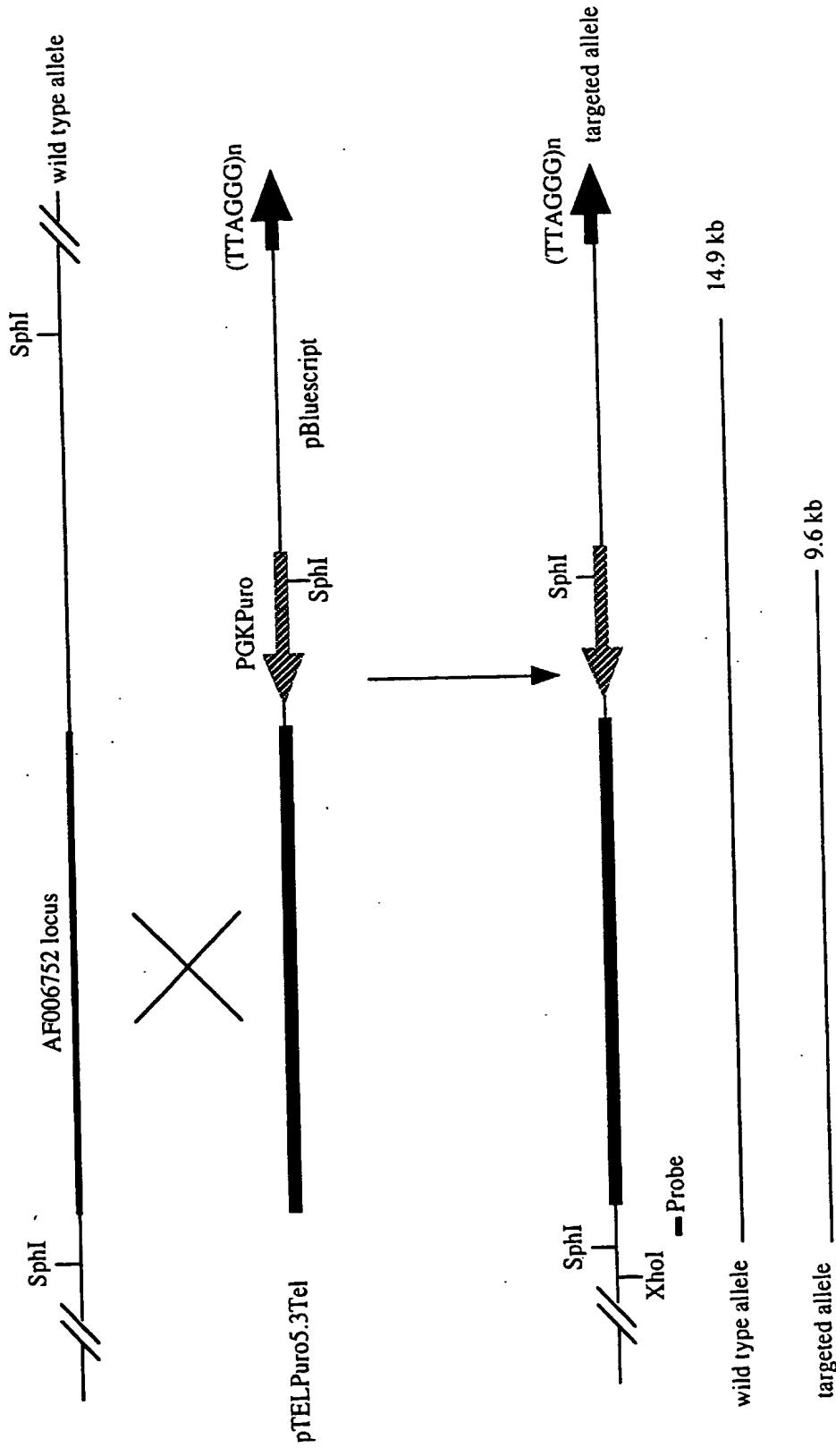
FIG. 9



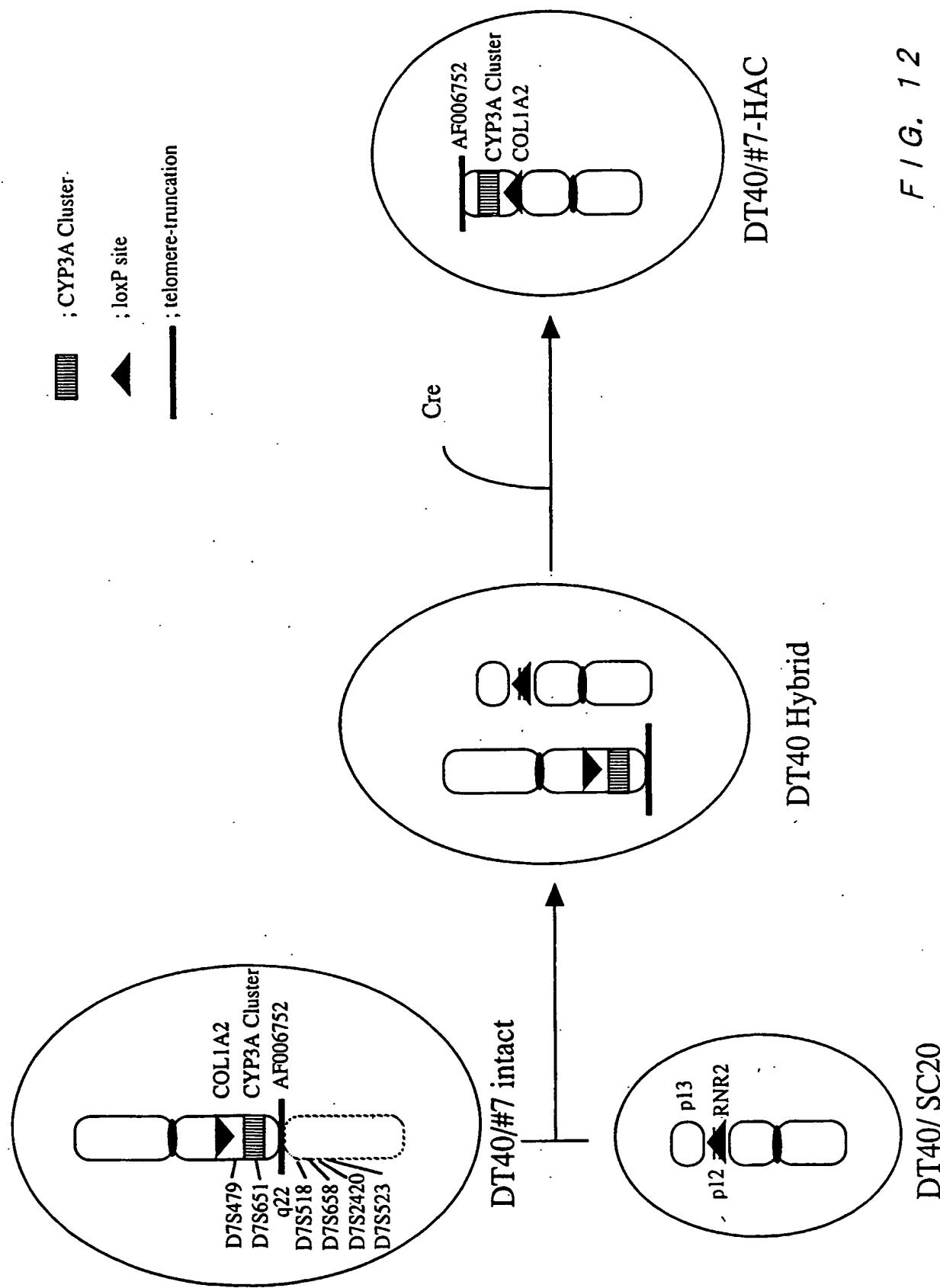
F / G. 10



F / G. 11



12/16



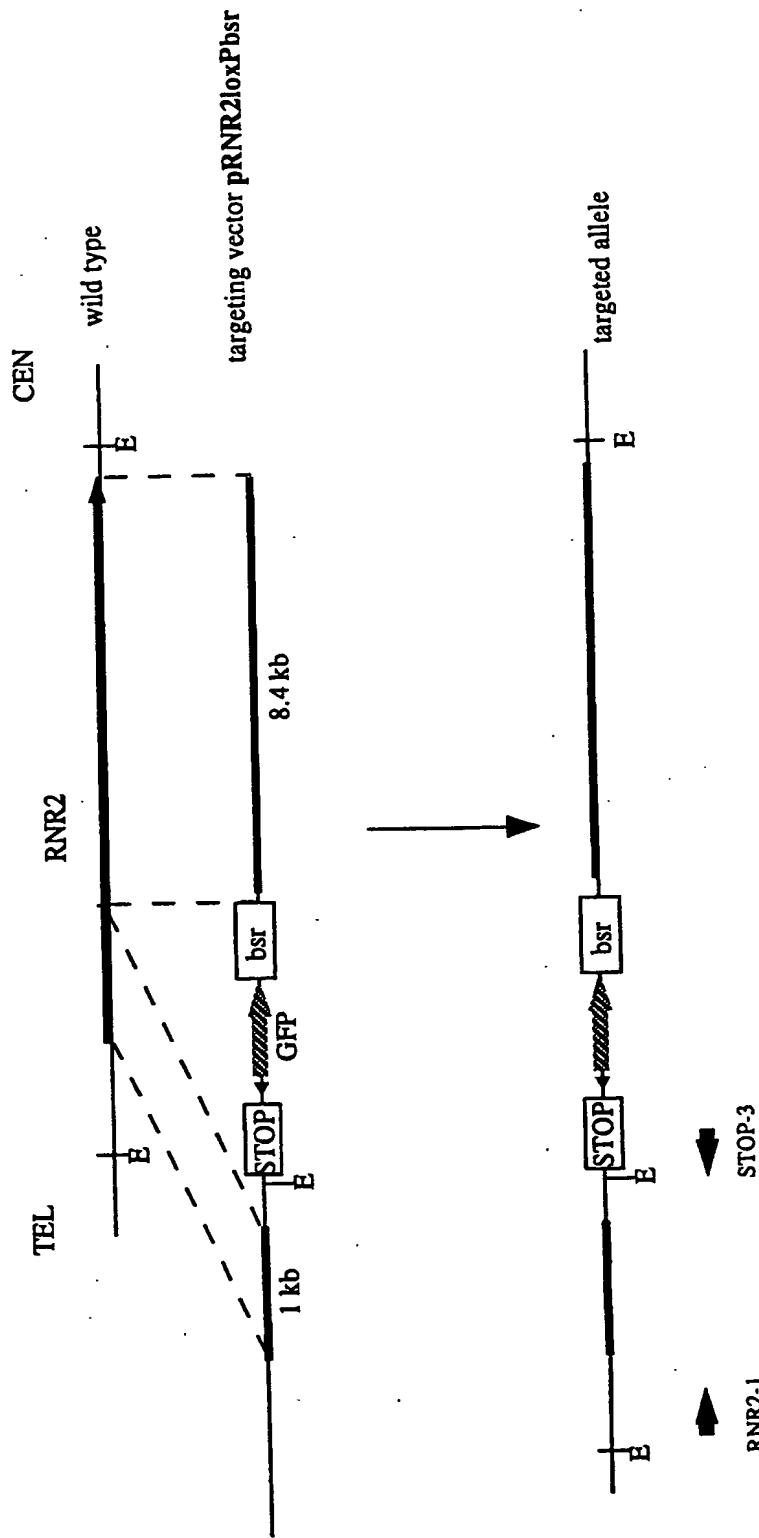
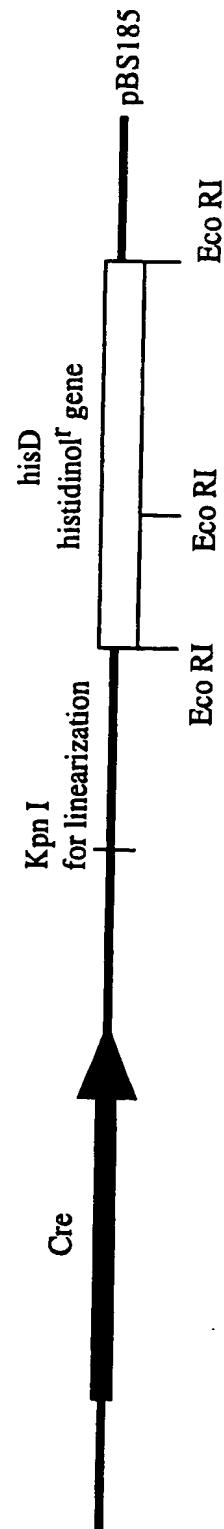


FIG. 13

FIG. 14

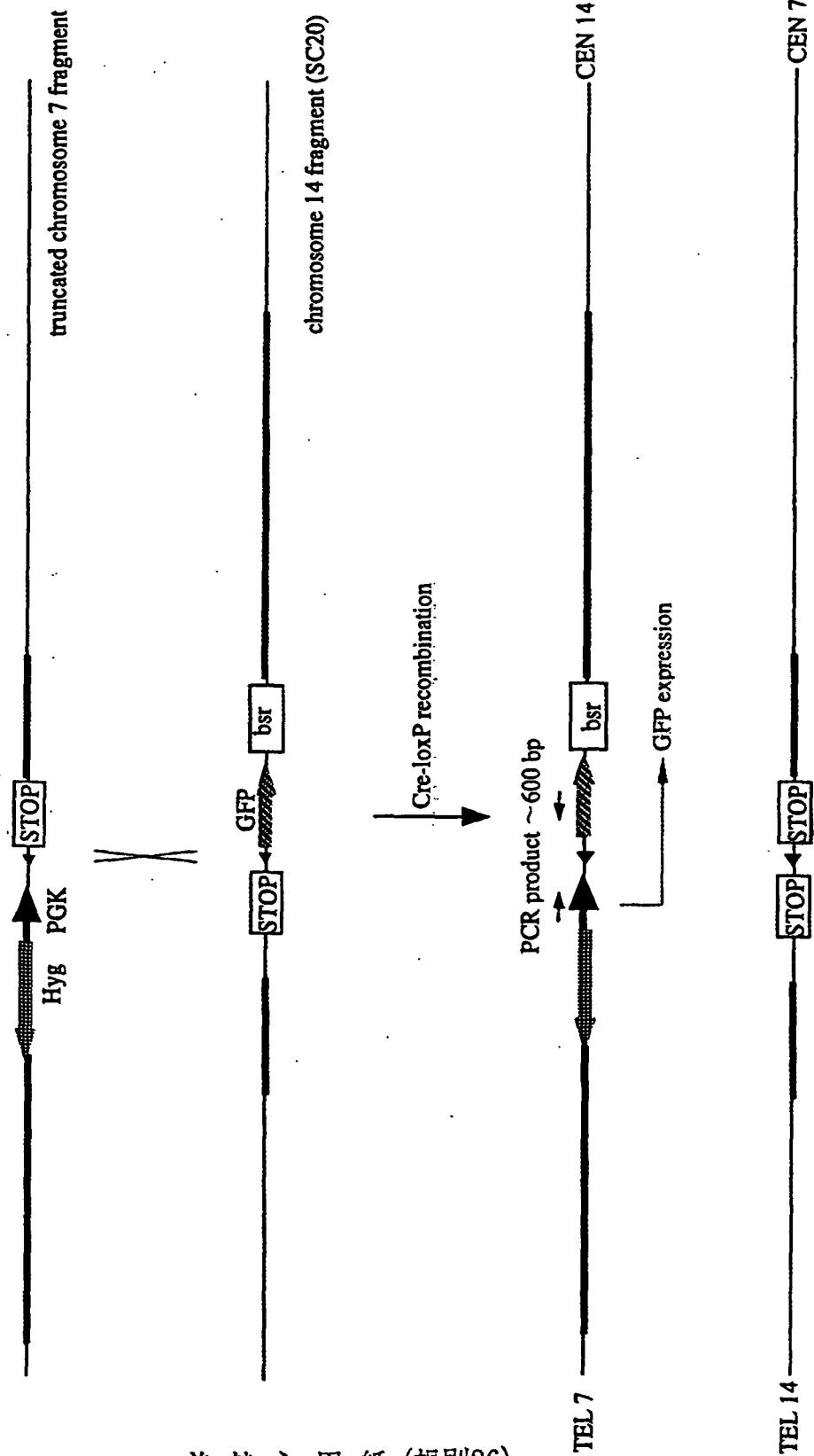
pBS185hisD

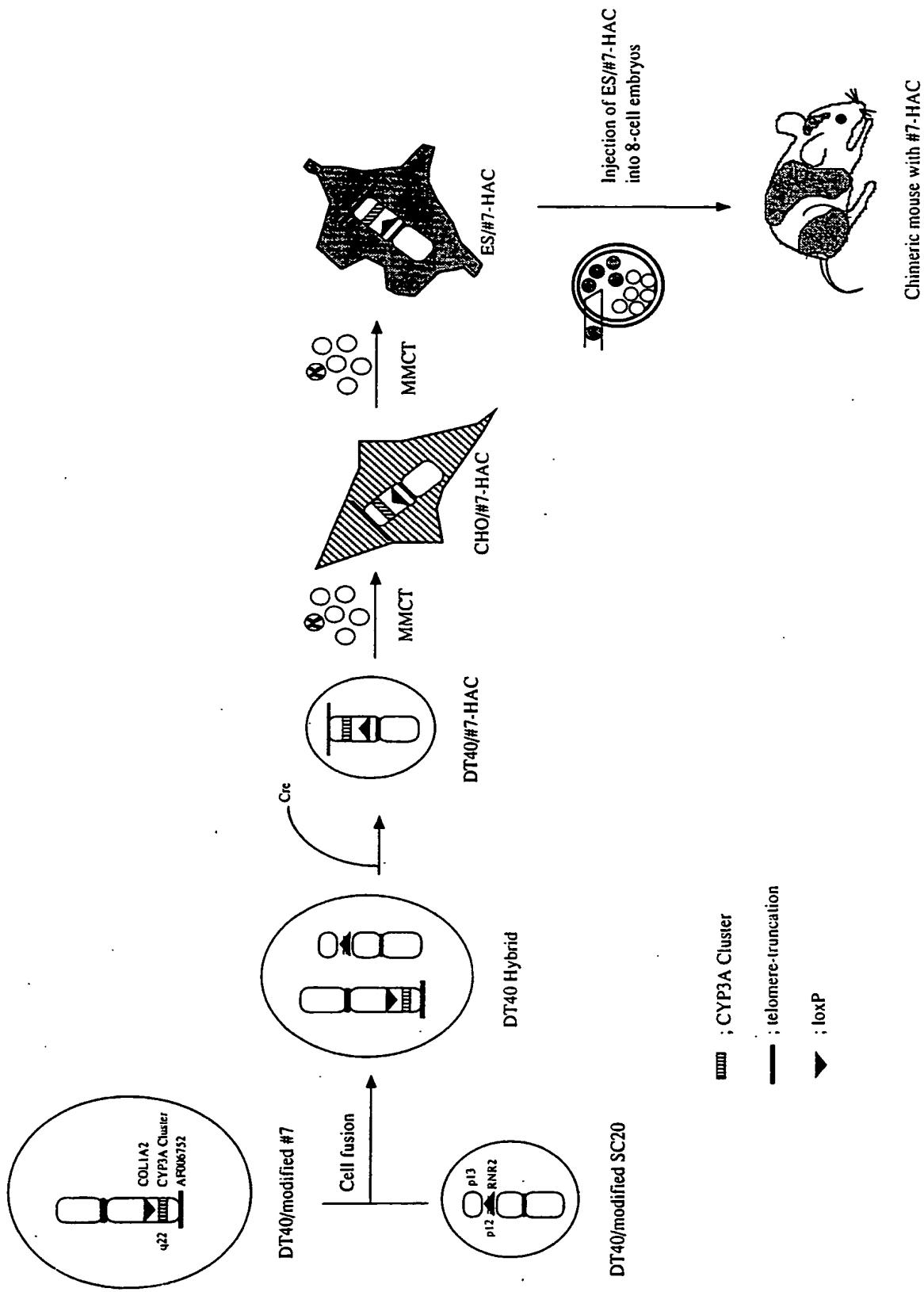


差替え用紙(規則26)

15/16

FIG. 15





F / G. 16

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> ヒトチトクローム P 4 5 0 遺伝子導入マウス

<130> OP1056PCT

<140>

<141> 2000-08-11

<150> JP 11-229094

<151> 1999-08-13

<160> 86

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A4

<400> 1

gtctgtctgg gtttggaaagg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A4

<400> 2
tctgtttgc tctttgctgg 20

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for detecting CYP3A5

<400> 3
atagaagggt ctgtctggct gg 22

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for detecting CYP3A5

<400> 4
tcagctgtgt gctgttgtt gc 22

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for detecting CYP3A7

<400> 5
accctgaaat gaagacggc 20

<210> 6

<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A7

<400> 6
gaggtaatgg tgcttaactgg gg 22

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A cDNA

<400> 7
caagaccct ttgtggaaaa 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A cDNA

<400> 8
tctgagcggtt tcattcacca 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A4 cDNA

<400> 9

gccatagaga caagggcaag

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A4 cDNA

<400> 10

tcagtgaggc tggatttgc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A5 cDNA

<400> 11

ctggtcaccc accatgtgtt

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A5 cDNA

<400> 12

tatcctctca cctgccttgc

20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A11 cDNA

<400> 13

gacacaatttg tcaagggatg g

21

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A11 cDNA

<400> 14

gctgacaaac aaggcagggat

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A13 cDNA

<400> 15

atgtacctgc cctttgggag

20

<210> 16

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A13 cDNA

<400> 16
ggagtgggtt ttctggttga

20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A16 cDNA

<400> 17
tggtctccca tatctcaggc

20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A16 cDNA

<400> 18
caatgtacca gtgagagcgc

20

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A25 cDNA

<400> 19

agaagaagag aaaggggagc c

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A25 cDNA .

<400> 20

cattcacacatgtccagg

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A25 cDNA

<400> 21

aaaccagaag aaccgagtgg

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
detecting CYP3A25 cDNA

<400> 22
gtgacaggta cttattggg 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for clone 679

<400> 23
tagggtaag acatggtggc 20

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for clone 679

<400> 24
ggaggagagg gagatgttga t 21

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for clone 9736

<400> 25
agatgtgtgg cttgttaag g 21

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for
clone 9736

<400> 26

tttctggatg tcactggtcc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 29H12

<400> 27

tagaagccca actttggac

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 29H12

<400> 28

agccaaacaag agggtgtacg

20

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
CYP3A25

<400> 29

ggcctgaact gctaaaggaa agcta

25

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for
CYP3A25

<400> 30

ggtgaacatc cacaactacc attgag

26

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 703

<400> 31

acagggagta ggtgacactg ttg

23

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 703

<400> 32
gggttgttgg actcacagag ag 22

<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for clone 703

<400> 33
gacctcacac tggcaagaag tc 22

<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for clone 703

<400> 34
atggtgctca gcaatagtag gg 22

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for clone 220H2

<400> 35
gcaggataacc agatatgtgg c 21

<210> 36

12/27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for
clone 220H2

<400> 36

aaacccctta aacccacagc

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 220H2

<400> 37

ggtgtcacac gcctttcatc

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 220H2

<400> 38

ctgctcaaag gagaacaggg

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for
clone 130A11

<400> 39

ccacacatTC tgccaatcag

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for
clone 130A11

<400> 40

agtacagcac cgggctaaag

20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 130A11

<400> 41

gcaacaataa cccaactgcc

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 130A11

<400> 42
caggtggtaa taagctgcc 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for
clone 29B19

<400> 43
gcatgaagca ctgtctcg 20

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for
clone 29B19

<400> 44
gggttcctcc tttcaatatc c 21

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 29B19

<400> 45
tctctgcctc tcataatgc c 21

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 29B19

<400> 46

tgtgtgtggg ttgggtgtctc

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 173D23

<400> 47

cggctctcac aaatagaccc

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 173D23

<400> 48

ccaggttatac gctgggttttc

20

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 86H16

<400> 49

tcacgacctt atgcaaagac c

21

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 86H16

<400> 50

cgggaagtat tgctttcagc

20

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for
clone 86H16

<400> 51

tcagtcgtta ccagccttt g

21

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for
clone 86H16

<400> 52

gagtgggctc tggtcatttc

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 204L9

<400> 53

tctcagcata gttcaggggc

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
clone 204L9

<400> 54

tttctttcag ctctgggtgg

20

<210> 55

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for
clone 741

<400> 55

gttcctctgt aattctaatt tacatccact gggtgaaagg tctatgataa

50

<210> 56

18/27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
lambda DOWN12

<400> 56

ttcgggaggc cagtactatt c

21

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for
lambda DOWN12

<400> 57

cacacacgtc ttttggcag

20

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
Cyp3aY

<400> 58

acggtttagt catgcttaggt g

21

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
Cyp3aY

<400> 59

tccatgacaa taaggctgcc

20

<210> 60

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
identification of cyp3A deleted strain

<400> 60

tgttctcctc ttccctactct cc

22

<210> 61

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
identification of cyp3A deleted strain

<400> 61

tgaaggtgtt gaccagtgtt gg

22

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
CYP3A4 and MDR1

<400> 62

ctcagaaact gtcaaggatg c

21

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
CYP3A4 and MDR1

<400> 63

cctaaaggaa acgaacagcg

20

<210> 64

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Sfil linker

<400> 64

pggccgcwgc ggcc

14

<210> 65

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
COL1A2

<400> 65

cgttagtacc caagtcaggc ttacattta ttttgt

36

<210> 66

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
COL1A2

<400> 66

cgttagtacc gagaatgagt ttgaccttat ccattt

36

<210> 67

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
AF006752

<400> 67

cgtaggatcc atgtttctgg aataacttgct gttatttag

38

<210> 68

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
AF006752

<400> 68

caaaaacaaac actattatca cttcacaa

28

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

22/27

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
preparing PS11 probe

<400> 69

agctttgggg gacaaaacat

20

<210> 70

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
preparing PS11 probe

<400> 70

caaaacagtc tgaacagaca ttcc

24

<210> 71

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
identification of recombinant

<400> 71

tttcttaggaa actgttaagaa aggtaagagt

30

<210> 72

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
identification of recombinant

<400> 72

tggttattcac tttaatatca cattatctcc 30

<210> 73
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer for confirmation of recombinant

<400> 73
tatcctttt aaagttattt tgaacactca 30

<210> 74
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer for confirmation of recombinant

<400> 74
atggtttcta caaagatcgt tatgtttate 30

<210> 75
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer for confirmation of recombinant

<400> 75
atttattattt gtcctgtttg tatcttcct 30

<210> 76
<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for confirmation of recombinant

<400> 76

atggtttcta caaagatcgt tatgtttac

30

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for RNR2

<400> 77

tcgagaattcaggtagctggcactatcttttgccatc

<210> 78

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for RNR2

<400> 78

tcgagaattc ggagaaagaa cacacaagga ctcggtc

37

<210> 79

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for identification of recombinant

<400> 79

tggatgtatc ctgtcaagag acc

23

<210> 80

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for identification of recombinant

<400> 80

cagacacactct atgcctgtgt gg

22

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for detection of human chromosome 7

<400> 81

gcaagactgt gagccagtga

20

<210> 82

<211> 20

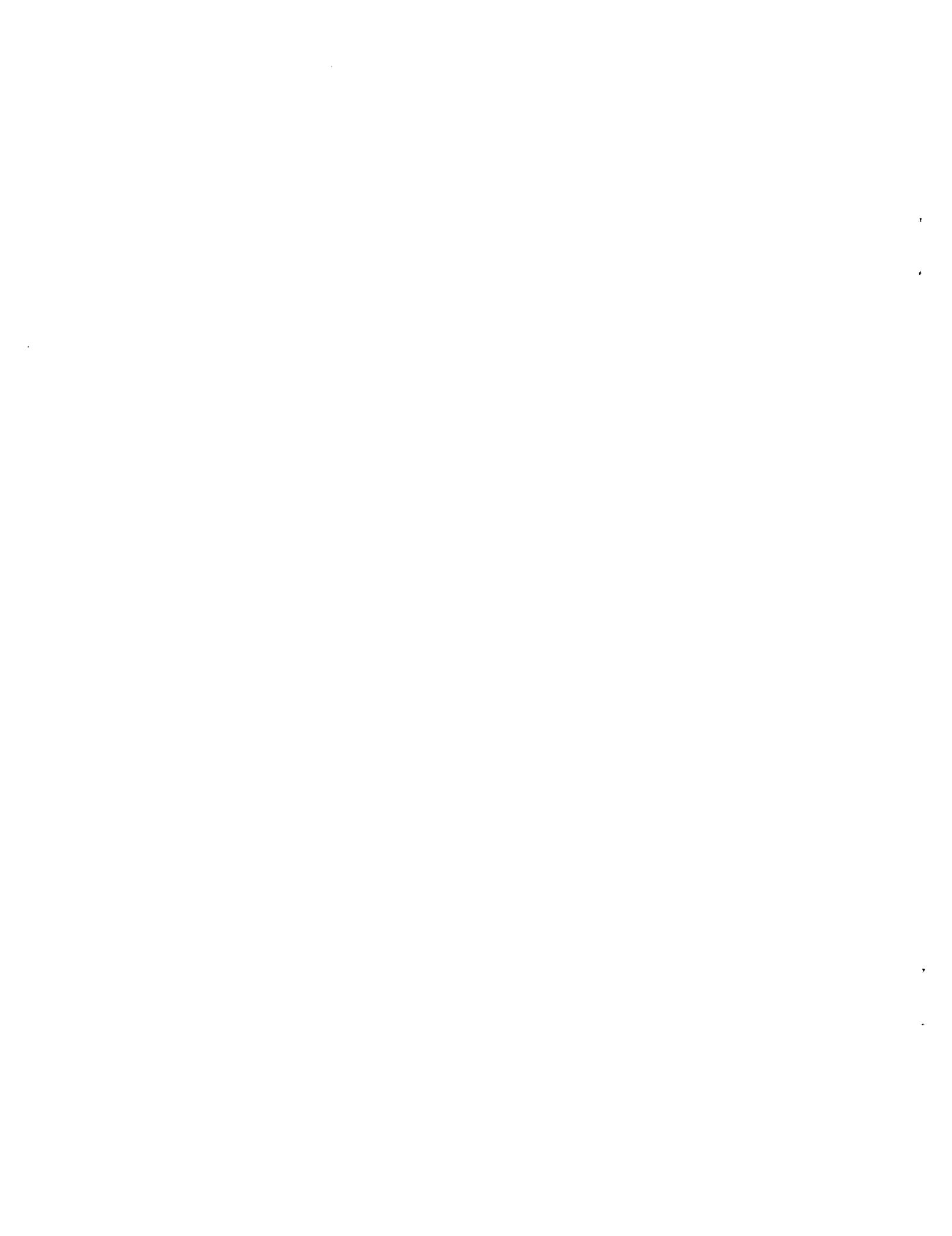
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for detection of human chromosome 7

<400> 82



ggctgcatca gcatcatcta 20

<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer for
detection of human chromosome 14

<400> 83
agtgagataa gcagtggatg 20

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer for
detection of human chromosome 14

<400> 84
gttgtgctac tcccatact 20

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer for
pgk

<400> 85
atagcagtt tgctcattcg 20

<210> 86
<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for
gfp

<400> 86

ttctctcctgcacatagccc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K 67/027, C12N 15/00, C12Q 1/68,
C12N 15/85, C12N 5/10, G01N 33/50, G01N 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K 67/027, C12N 15/00, C12Q 1/68,
C12N 15/85, C12N 5/10, G01N 33/50, G01N 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, WPI, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R. Ramsden et al., J. Biol. Chem., Vol.268 (29), pp.21722-21726 (1993)	1 2-9
Y	Tetsuya KAMATAKI et al., Yakubutsu Doutai, Vol.13 (3), pp.280-286 (1998)	1-9,12-24
Y	D. R. Nelson et al., Pharmacogenetics, Vol.6, pp.1-42 (1996)	1-9,11-24
Y	K. Tomizuka et al., Nature Genetics, vol.16, pp.133-143 (1997)	1-9,21-24
Y	EP, 773288, A3 (KIRIN BEER KK. et al.), 09 July, 1997 (09.07.97) & WO, 9707671, A1 & AU, 9668376, A & JP, 7-10126, X & CN, 1200014, A & KR, 99044300, A	1-9,21-24
Y	AU, 9861189, A (KIRIN BEER KK.), 18 September, 1998 (18.09.98) & WO, 9837757, A1	1-9,21-24

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 November, 2000 (06.11.00)

Date of mailing of the international search report
14 November, 2000 (14.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National application No.

PCT/JP00/05424

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	A. Schedl et al., Nature, Vol.362, pp.255-258 (1993)	1-9,21-24
Y	T. Shiina et al., Genomics, Vol.47, pp.372-382 (1998)	10
Y	R. S.Hubert et al., Genomics, Vol.41, pp.218-226 (1997)	10
Y	Z-W. Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.93, pp.6158-6162 (1996)	6-9,12-24
Y	H. Gu et al., Science, vol.265, pp.103-106 (1994)	6-9,12-24
A	Y. Li et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, vol.329(2), pp.235-240 (1996)	1-9,11-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05424

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

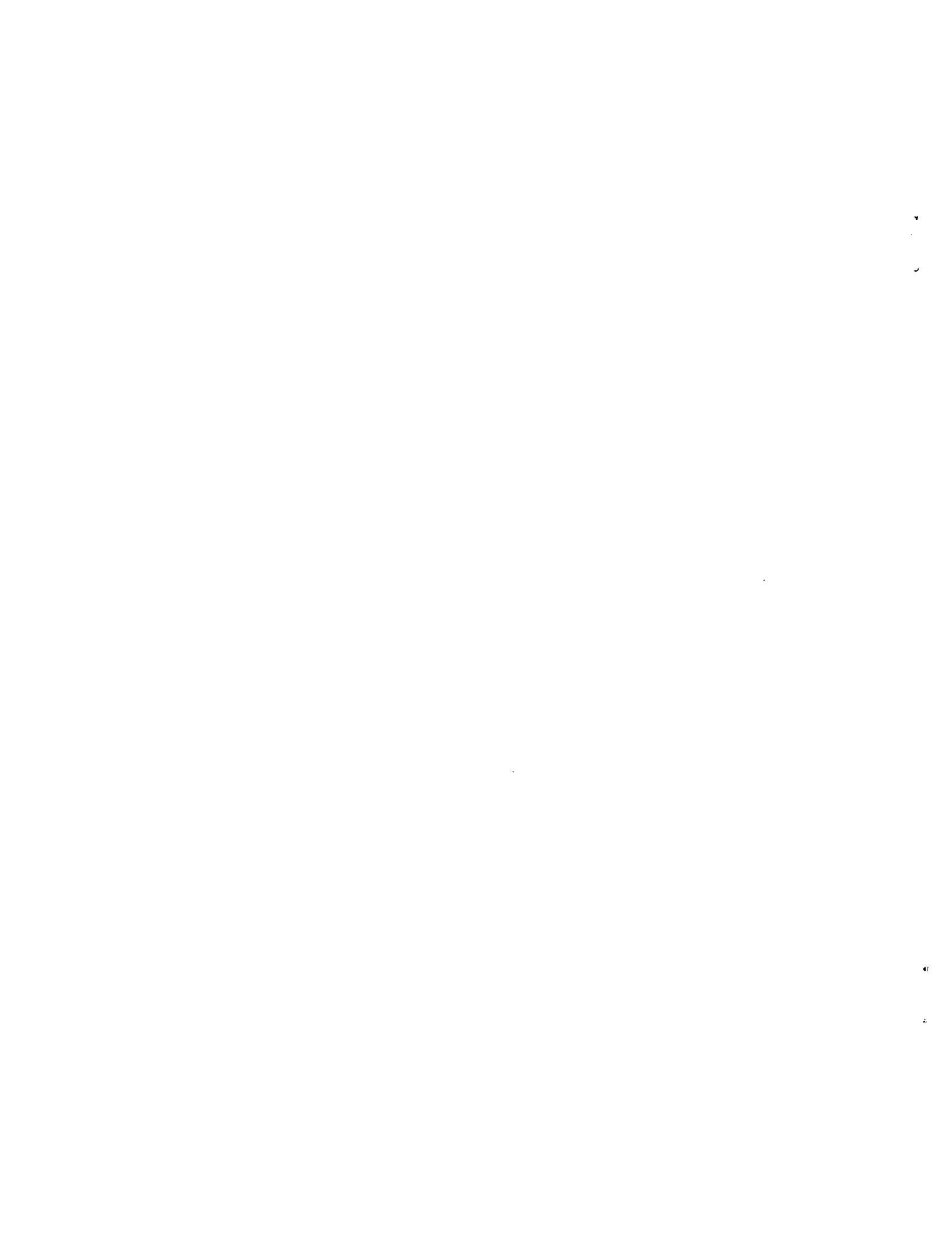
1. Claims Nos.: 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 is merely the disclosure of information and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05424

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. A01K 67/027, C12N 15/00, C12Q 1/68,
 C12N 15/85, C12N 5/10, G01N 33/50, G01N 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. A01K 67/027, C12N 15/00, C12Q 1/68,
 C12N 15/85, C12N 5/10, G01N 33/50, G01N 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, WPI, MEDLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	R. Ramsden et al., J. Biol. Chem., vol. 268(29), p. 21722-21726	1
Y	(1993)	2-9
Y	鎌滝哲也ら, 薬物動態, vol. 13(3), p. 280-286 (1998)	1-9, 12-24
Y	D. R. Nelson et al., Pharmacogenetics, vol. 6, p. 1-42 (1996)	1-9, 11-24
Y	K. Tomizuka et al., Nature Genetics, vol. 16, p. 133-143 (1997)	1-9, 21-24

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.11.00

国際調査報告の発送日

14.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

長井 啓子



2B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C(続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP, 773288, A3 (KIRIN BEER KK. et al.) 09. Jul. 1997 (09. 07. 97) & WO, 9707671, A1 & AU, 9668376, A & JP, 7-10126, X & CN, 1200014, A & KR, 99044300, A	1-9. 21-24
Y	AU, 9861189, A (KIRIN BEER KK.) 18. Sep. 1998 (18. 09. 98) & WO, 9837757, A1	1-9. 21-24
Y	A. Schedl et al., Nature, vol. 362, p. 255-258 (1993)	1-9. 21-24
Y	T. Shiina et al., Genomics, vol. 47, p. 372-382 (1998)	10
Y	R. S. Hubert et al., Genomics, vol. 41, p. 218-226 (1997)	10
Y	Z-W. Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 93, p. 6158-6162 (1996)	6-9, 12-24
Y	H. Gu et al., Science, vol. 265, p. 103-106 (1994)	6-9, 12-24
A	Y. Li et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 329(2), p. 235-240 (1996)	1-9, 11-24

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 11 は、情報の単なる開示であり、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

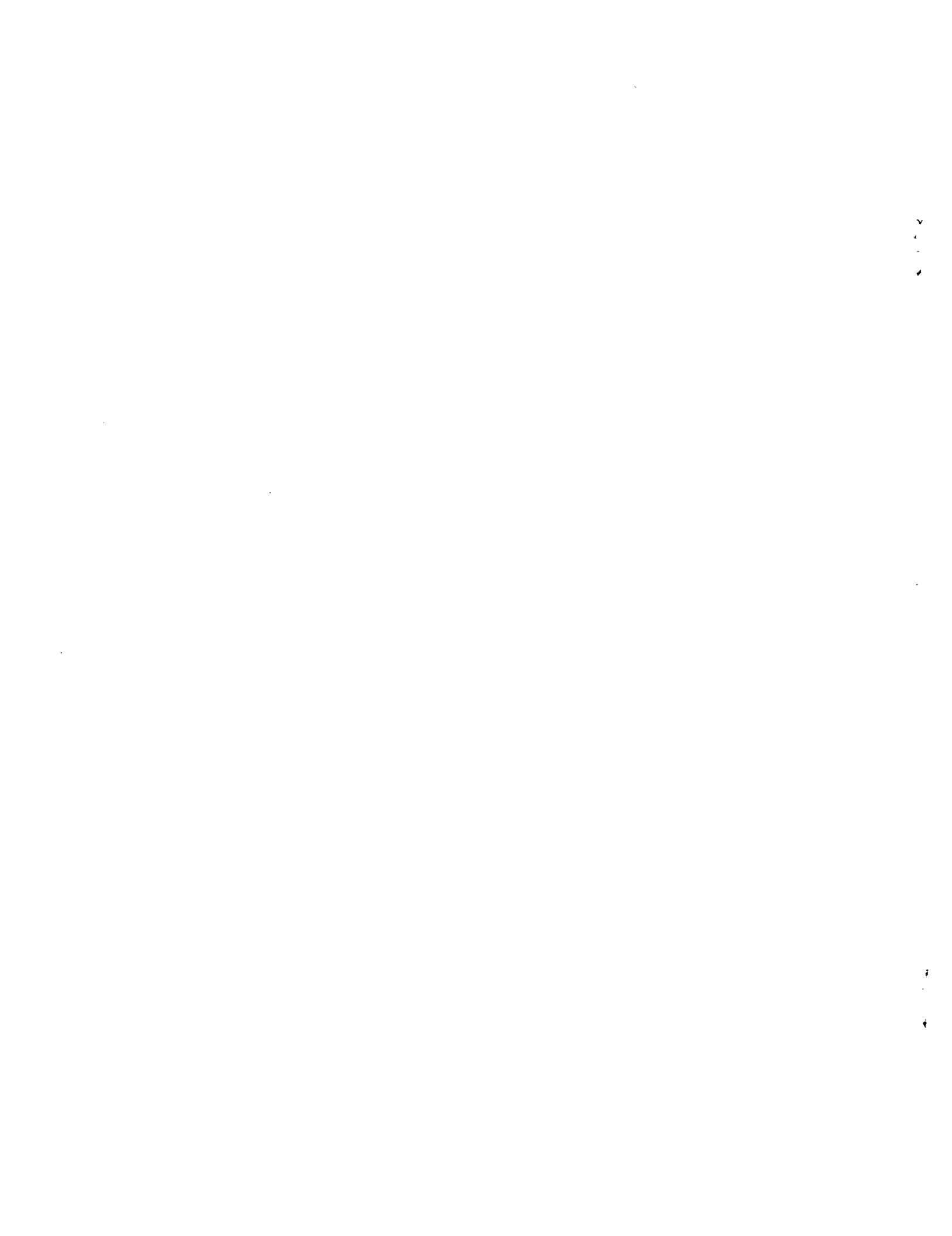
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



77
Translation
10/049373

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference OP1056-PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/05424	International filing date (day/month/year) 11 August 2000 (11.08.00)	Priority date (day/month/year) 13 August 1999 (13.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/027, C12N 15/00, C12Q 1/68, C12N 15/85, 5/10, G01N 33/50, 33/15		
Applicant	KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 February 2001 (22.02.01)	Date of completion of this report 15 August 2001 (15.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

PCT/JPO/05424

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. _____ 11 _____

because:

the said international application, or the said claims Nos. _____ 11 _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1.

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/05424

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10, 12-24	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10, 12-24	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10, 12-24	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: R. Ramsden et al., J. Biol. Chem., Vol. 268 (29), pp. 21722-21726 (1993)

Document 2: D. R. Nelson et al., Pharmacogenetics, Vol. 6, pp. 1-42 (1996)

Document 3: EP, 773288, A3 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 9 July 1997 (09.07.97) & WO, 9707671, A1 & AU, 9668376, A & JP, 7-10126, X & CN, 1200014, A & KR, 99044300, A

Document 4: R. S. Hubert et al., Genomics, Vol. 41, pp. 372-382 (1998)

Document 5: Z-W. Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 93, pp. 6158-6162 (1996)

(1) Claims 1, 8 and 9

Document 1 discloses a transgenic mouse into which a rat CYP2B2 gene has been introduced together with a 19 kb 5' region thereof, which is induced and expressed by phenobarbital. Moreover, Document 2 discloses the fact that many genes belonging to the human cytochrome P450 gene family are known. Therefore, introduction of a human cytochrome P450 gene disclosed in Document 2 together with a 5' region thereof so as to give the inventions set forth in these claims of the present invention is within the realm of obviousness to a person skilled in the art.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/05424

Therefore, the invention set forth in Claim 1 does not involve an inventive step in the light of Document 1 and Document 2.

(2) Claim 2

See (1). In addition, Document 2 discloses members of the CYT3A family within human cytochrome P450 genes.

Therefore, the invention set forth in this claim of the present application does not involve an inventive step in the light of Documents 1 and 2.

(3) Claims 3-5

See (1). In addition, as disclosed in Document 3, microcell fusion and YAC vectors are known methods for introducing a large gene.

Therefore, the invention set forth in this claim of the present application does not involve an inventive step in the light of Documents 1-3.

(4) Claim 6

See (1). In addition, it is common practice in animals into which a gene has been introduced to destroy endogenous homologues to the introduced gene.

Therefore, the invention set forth in this claim of the present application does not involve an inventive step in the light of Documents 1, 2 and the aforementioned known practice.

(5) Claim 7

See (4). In addition, use of a Cre-loxP system to destroy a target gene is known, as disclosed, for example, in Document 5.

Therefore, the invention set forth in this claim of the present application does not involve an inventive step in the light of Documents 1 and 2 and the aforementioned

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/JP 00/05424

known practice.

(6) Claim 10

The invention set forth in this claim of the present invention is merely application of a known chromosome walking method, disclosed in Document 5 for example, to the mouse Cyp3a gene disclosed in Document 2.

Therefore, the invention set forth in this claim of the present application does not involve an inventive step in the light of Document 2 and the aforementioned known practice.

(7) Claims 12 and 13

The inventions set forth in these claim are merely the application of a known chromosome walking method disclosed, for example, in Document 4, and construction of a targeting vector by using a Cre-loxP system as disclosed, for example, in Document 6, to the mouse Cyp3a gene disclosed in Document 2.

Therefore, the inventions set forth in these claims of the present application do not involve an inventive step in the light of Document 2 and the aforementioned known practice.

(8) Claims 14-20

The inventions set forth in these claim are merely the application of a known chromosome walking method disclosed, for example, in Document 4, and gene targeting by using a Cre-loxP system as disclosed, for example, in Document 5, to the mouse Cyp3a gene disclosed in Document 2.

Therefore, the inventions set forth in these claims of the present application do not involve an inventive step in the light of Document 2 and the aforementioned known practice.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/05424

(9) Claim 21

See (1) and (8). In addition, it is common practice in animals into which a gene has been introduced to destroy endogenous homologues to the introduced gene.

Therefore, the invention set forth in this claim of the present application does not involve an inventive step in the light of Documents 1, 2 and the aforementioned known practice.

(10) Claims 22 and 23

See (9). In addition, production of biologically active components by using genetically modified non-human animals is known.

Therefore, the invention set forth in this claim of the present application does not involve an inventive step in the light of Documents 1, 2 and the aforementioned known practice.

(11) Claim 24

See (9). In addition, testing of the pharmacological action and metabolism of a drug by administering said drug to a genetically modified non-human animals is known.

Therefore, the invention set forth in this claim of the present application does not involve an inventive step in the light of Documents 1, 2 and the aforementioned known practice.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/JP 00/05424**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

Claim 11 is a mere presentation of information, and thus relates to subject matter which does not require international preliminary examination by this International Preliminary Examining Authority.



10/049373

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 31 AUG 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 OP1056-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05424	国際出願日 (日.月.年) 11.08.00	優先日 (日.月.年) 13.08.99
国際特許分類 (IPC) Int. C1. 7 A01K 67/027, C12N 15/00, C12Q 1/68, C12N 15/85, C12N 5/10, G01N33/50, G01N 33/15		
出願人（氏名又は名称） 麒麟麦酒株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の単一性の欠如
- V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.02.01	国際予備審査報告を作成した日 15.08.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 長井 啓子  電話番号 03-3581-1101 内線 3236



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ ページ、 | |
| <input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ ページ、 | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの
PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、 | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、 | |
| <input type="checkbox"/> 図面 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 第 _____ ページ/図、 | |
| <input type="checkbox"/> 図面 第 _____ ページ/図、 | |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 | |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 | |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

{

III. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

国際出願全体

請求の範囲 11

理由：

この国際出願又は請求の範囲 11 は、国際予備審査をすることを要しない
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 11 は、情報の単なる開示であり、この国際予備審査期間が国際予備
審査をすることを要しない対象に係るものである。

明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 _____ の
記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な
裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

請求の範囲 _____ について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成ためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 1 - 10, 12 - 24	有
	請求の範囲 _____	無
進歩性 (I S)	請求の範囲 1 - 10, 12 - 24	有
	請求の範囲 _____	無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲 1 - 10, 12 - 24	有
	請求の範囲 _____	無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : R. Ramsden et al., J. Biol. Chem., vol. 268(29), p. 21722-21726 (1993)

文献2 : D. R. Nelson et al., Pharmacogenetics, vol. 6, p. 1-42 (1996)

文献3 : EP 773288 A3 (KIRIN BEER KK. et al.) 09. Jul. 1997 (09. 07. 97)

& WO 9707671 A1 & AU 9668376 A & JP 7-10126 X

& CN 1200014 A & KR 99044300 A

文献4 : R. S. Hubert et al., Genomics, vol. 41, p. 372-382 (1998)

文献5 : Z-W. Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 93, p. 6158-6162 (1996)

(1) 請求項1, 8, 9について

文献1には、ラットCYP2B2遺伝子をその5'の19kbと共に導入したトランスジェニックマウスは同遺伝子をフェノバービタルで誘導発現することが開示されている。また、文献2に開示されているとおり、ヒトチトクロームP450遺伝子群に属する遺伝子は数多く知られている。文献2に開示されたヒトチトクロームP450遺伝子についてもその5'領域を共に導入することによって、本請求項記載の発明とすることは、当業者にとって自明の範囲内のことと認める。

よって、本請求項記載の発明は、文献1及び2により進歩性を有しない。

(2) 請求項2について

上記(1)を参照のこと。また、文献2にはヒトチトクロームP450遺伝子のうちCYT3Aファミリーのメンバーが開示されている。

よって、本請求項記載の発明は、文献1及び2により進歩性を有しない。

(3) 請求項3-5について

上記(1)を参照のこと。また、文献3に開示されているとおり巨大遺伝子を導入する方法としてミクロセル融合法及YACベクター法が知られている。

よって、本請求項記載の発明は、文献1-3により進歩性を有しない。

(4) 請求項6について

上記(1)を参照のこと。また、遺伝子導入動物において、該導入遺伝子の内在ホモログを破壊することは広く行われている。

よって、本請求項記載の発明は、文献1, 2及び上記周知技術により進歩性を有しない。



補充欄（いざれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること）

第 V 欄の続き

(5) 請求項 7について

上記(4)を参照のこと。また、標的遺伝子の破壊方法としてCre-loxPの系は、例えば文献5に開示されているとおり周知である。

よって、本請求項記載の発明は、文献1, 2及び上記周知技術により進歩性を有しない。

(6) 請求項 10について

本請求項記載の発明は、例えば文献5に開示された周知の染色体ウォーキング法を文献2に開示されたマウスCyp3a遺伝子に適用したものにすぎない。

よって、本請求項記載の発明は、文献2及び上記周知技術により進歩性を有しない。

(7) 請求項 12, 13について

本請求項記載の発明は、文献2に開示されたマウスCyp3a遺伝子について、例えば文献4に開示された周知の染色体ウォーキング法及び例えば文献6に開示されたCre-loxPの系を用いてターゲティングベクターを構築したものにすぎない。

よって、本請求項記載の発明は、文献2及び上記周知技術により進歩性を有しない。

(8) 請求項 14 – 20について

本請求項記載の発明は、文献2に開示されたマウスCyp3a遺伝子について、例えば文献4に開示された周知の染色体ウォーキング法及び例えば文献5に開示されたCre-loxPの系を用いたジーンターゲティングを行ったものにすぎない。

よって、本請求項記載の発明は、文献2及び上記周知技術により進歩性を有しない。

(9) 請求項 21について

上記(1)及び(8)を参照のこと。また、遺伝子導入動物において、該導入遺伝子の内在ホモログを破壊することは広く行われている。

よって、本請求項記載の発明は、文献1, 2及び上記周知技術により進歩性を有しない。

(10) 請求項 22 及び 23について

上記(9)を参照のこと。また、遺伝子改変非ヒト動物を用いて生物学的活性成分を製造することは周知である。

よって、本請求項記載の発明は、文献1, 2及び上記周知技術により進歩性を有しない。

(11) 請求項 24について

上記(9)を参照のこと。また、遺伝子改変非ヒト動物に薬物を投与して該薬物の薬理作用や代謝を試験することは周知である。

よって、本請求項記載の発明は、文献1, 2及び上記周知技術により進歩性を有しない。



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
 [PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 O P 1 0 5 6 - P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05424	国際出願日 (日.月.年) 11.08.00	優先日 (日.月.年) 13.08.99
出願人 (氏名又は名称) 麒麟麦酒株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。
 この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない (第I欄参照)。

3. 発明の單一性が欠如している (第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものを承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。



第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 11 は、情報の単なる開示であり、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. 7 A01K 67/027, C12N 15/00, C12Q 1/68,
C12N 15/85, C12N 5/10, G01N 33/50, G01N 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. 7 A01K 67/027, C12N 15/00, C12Q 1/68,
C12N 15/85, C12N 5/10, G01N 33/50, G01N 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, WPI, MEDLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	R. Ramsden et al., J. Biol. Chem., vol. 268(29), p. 21722-21726	1
Y	(1993)	2-9
Y	鎌滝哲也ら, 薬物動態, vol. 13(3), p. 280-286 (1998)	1-9, 12-24
Y	D. R. Nelson et al., Pharmacogenetics, vol. 6, p. 1-42 (1996)	1-9, 11-24
Y	K. Tomizuka et al., Nature Genetics, vol. 16, p. 133-143 (1997)	1-9, 21-24

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.11.00

国際調査報告の発送日

14.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

長井 啓子

2B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP, 773288, A3(KIRIN BEER KK. et al.)09.Jul.1997(09.07.97) & WO, 9707671, A1 & AU, 9668376, A & JP, 7-10126, X & CN, 1200014, A & KR, 99044300, A	1-9.21-24
Y	AU, 9861189, A(KIRIN BEER KK.)18.Sep.1998(18.09.98) & WO, 9837757, A1	1-9.21-24
Y	A. Schedl et al., Nature, vol. 362, p. 255-258 (1993)	1-9.21-24
Y	T. Shiina et al., Genomics, vol. 47, p. 372-382 (1998)	10
Y	R. S. Hubert et al., Genomics, vol. 41, p. 218-226 (1997)	10
Y	Z-W. Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 93, p. 6158-6162 (1996)	6-9, 12-24
Y	H. Gu et al., Science, vol. 265, p. 103-106 (1994)	6-9, 12-24
A	Y. Li et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 329(2), p. 235-240 (1996)	1-9, 11-24

***** WO98/037757 パテントファミリー文献番号回答印刷 *****

2000年11月21日 1 / 1

1 WO-A1- 098037757 1998.09.03 6A 01K 67/027 A
2 AU-A - 006118998 1998.09.18 6A 01K 67/027 A

最易読 最先公知

